



Rúben Diogo Marques da Silva

Licenciado em Bioquímica

**Estudo da Influência do pH e
Temperatura na Estrutura Secundária
de Agregados de Poliglutaminas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutor César Laia

Co-orientador: Doutor João Galamba Correia



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017

Estudo da Influência do pH e Temperatura na Estrutura Secundária de Agregados de Poliglutaminas.

Copyright © Rúben Diogo Marques da Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa hereditária para a qual não existe cura conhecida. Uma mutação no gene *HD* aumenta o número de repetições do aminoácido glutamina presente na proteína huntingtina. Apesar da estrutura e toxicidade das proteínas mutantes não ser clara, vários estudos demonstraram que o tamanho da cadeia de poliglutaminas afecta a formação de agregados. O estudo aqui apresentado teve como objectivo a síntese e caracterização química de pequenos péptidos com número controlado de glutaminas na sua estrutura primária e a caracterização estrutural por Dicroísmo Circular (CD) e Dispersão de Luz Dinâmica (DLS) dos agregados formados. Os péptidos do tipo Ac-K₂WQ_nAK₂-NH₂ (n = 8, Q8; n = 12, Q12 e n = 16, Q16) foram sintetizados por Fmoc-SPPS. As poliglutaminas foram obtidas com pureza ≥98%. Resultados de CD para as três poliglutaminas mostraram uma estrutura predominantemente desorganizada para a Q8 e Q12, e em folha-β para a Q16. Ensaio a diferentes temperaturas mostraram uma diminuição da percentagem de folha-β durante o aquecimento das amostras. Os ensaios de DLS mostraram a existência de diferentes tipos de agregados. Os resultados obtidos parecem relacionar as proporções de estrutura de folha-β e desordenada de cada poliglutamina com cada uma das populações de agregados.

Termos Chave: Agregados, Dicroísmo Circular, Dispersão de Luz Dinâmica, Estrutura Secundária, Poliglutamina, Síntese de Péptidos em Fase Sólida.

Abstract

Huntington's disease is a hereditary neurodegenerative disease for which there is no known cure. A mutation in the *HD* gene increases the number of glutamine repeats present in the huntingtin protein. Although the structure and toxicity of the mutant proteins is unclear, several studies have shown that the size of the polyglutamine chain affects the formation of aggregates. The aim of the present study is to synthesize and characterize small peptides with controlled numbers of glutamines in their primary structure and the structural characterization by Circular Dichroism (CD) and Dynamic Light Scattering (DLS) of the aggregates formed. Peptides of the type Ac-K₂WQ_nAK₂-NH₂ (n = 8, Q8; n = 12, Q12 and n = 16, Q16) were synthesized by Fmoc-SPPS. Polyglutamines were obtained with ≥98% purity. CD results for the three polyglutamines have shown a predominantly disorganized structure for Q8 and Q12, and of β-sheet for Q16. Tests at different temperatures have shown a decrease in the amount of β-sheet during sample heating. DLS revealed the existence of different types of aggregates. The results obtained suggest that there is a relationship between the β-sheet and disorder structure ratios of each polyglutamine and each of the aggregate populations.

Keywords: Aggregates, Circular Dichroism, Dynamic Light Scattering, Polyglutamine, Secondary Structure, Solid Phase Peptide Synthesis,

Índice

RESUMO	II
ABSTRACT	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABELAS.....	IX
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. POLIGLUTAMINAS	1
1.1.1. <i>Péptidos</i>	1
1.1.2. <i>Glutamina e Poliglutamina</i>	1
1.1.3. <i>Doença de Huntington</i>	2
1.2. SÍNTESE DE PÉPTIDOS EM FASE SÓLIDA (SPPS).....	2
1.2.1. <i>Fmoc e Boc SPPS</i>	3
1.2.2. <i>Resinas para SPPS</i>	4
1.3. DICROÍSMO CIRCULAR	4
1.4. DISPERSÃO DE LUZ DINÂMICA	6
1.5. OBJECTIVOS	6
2. MATERIAIS.....	7
2.1. SÍNTESE DE PÉPTIDOS E PURIFICAÇÃO	7
2.1.1. <i>Síntese</i>	7
2.1.2. <i>Purificação</i>	7
2.2. DICROÍSMO CIRCULAR	8
2.3. DISPERSÃO DE LUZ DINÂMICA	8
2.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	8
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	9
3.1.1. SÍNTESE DE PÉPTIDOS EM FASE SÓLIDA.....	9
3.1.2. <i>Síntese automatizada</i>	9
3.1.3. <i>Preparação das amostras para HPLC</i>	9
3.1.4. <i>Purificação por HPLC</i>	10
3.1.5. <i>Determinação da concentração</i>	11
3.2. ESTUDO ESTRUTURAL DAS POLIGLUTAMINAS E AGREGADOS.....	11

3.2.1.	<i>Estudo da variação estrutural das poliglutaminas com o pH.....</i>	<i>11</i>
3.2.2.	<i>Estudo da variação estrutural das poliglutaminas com a temperatura</i>	<i>11</i>
3.2.3.	<i>Avaliação da cinética estrutural ao longo do tempo.....</i>	<i>12</i>
3.3.	ESTUDO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS POR DLS	12
4.	RESULTADOS.....	13
4.1.	SÍNTESE E PURIFICAÇÃO	13
4.2.	DICROÍSMO CIRCULAR	13
4.2.1.	<i>Estudo estrutural dos agregados de poliglutaminas a diferentes pH's.</i>	<i>13</i>
4.2.2.	<i>Efeito da temperatura na estrutura secundária.....</i>	<i>15</i>
4.2.3.	<i>Estudo cinético estrutural</i>	<i>19</i>
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS EM SOLUÇÃO POR DLS.....	21
5.	DISCUSSÃO	23
5.1.	SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	23
5.1.1.	<i>Aminoácidos e sequência dos péptidos</i>	<i>23</i>
5.1.2.	<i>Síntese Automática</i>	<i>23</i>
5.1.3.	<i>Purificação das poliglutaminas.....</i>	<i>24</i>
5.2.	ESTUDO ESTRUTURAL DAS POLIGLUTAMINAS E SEUS AGREGADOS	25
5.2.1.	<i>Efeito do pH na estrutura secundária.....</i>	<i>25</i>
5.2.2.	<i>Efeito da Temperatura na estrutura secundária</i>	<i>26</i>
5.2.3.	<i>Análise cinética das poliglutaminas</i>	<i>26</i>
5.2.4.	<i>Análise do tamanho de partículas em solução.....</i>	<i>27</i>
6.	CONCLUSÃO.....	29
	BIBLIOGRAFIA.....	31
	ANEXOS	34

Índice de Figuras

FIG. 1 – REPRESENTAÇÃO DO AMINOÁCIDO GLUTAMINA.	1
FIG. 2 – ESTRUTURA DA REGIÃO TERMINAL DA PROTEÍNA ATAXINA-3. ^[11]	2
FIG. 3 – ESQUEMA GERAL DO PROCESSO DE SPPS.	3
FIG. 4 – POLÍMERO DE POLIETILENOGLICOL.	4
FIG. 5 – ESPECTRO DE DICROÍSMO CIRCULAR DA POLI-L-LISINA NAS TRÊS PRINCIPAIS CONFORMAÇÕES. ^[17]	5
FIG. 6 – ESPECTRO DE CD DE VÁRIOS PÉPTIDOS COM DIFERENTE NÚMERO DE POLIGLUTAMINAS. ^[18]	5
FIG. 7 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO MÉTODO DE ELUIÇÃO UTILIZADO NA ETAPA DE PURIFICAÇÃO.	10
FIG. 8 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO MÉTODO DE ELUIÇÃO UTILIZADO NO SISTEMA DE HPLC ANALÍTICO.	10
FIG. 9 – ESPECTROS DE CD DAS POLIGLUTAMINAS A DIFERENTES PH'S.....	14
FIG. 10 – ESPECTROS DE CD DA AMOSTRA Q8 A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	16
FIG. 11 – ESPECTROS DO PÉPTIDO Q12 DURANTE O CICLO DE AQUECIMENTO.	17
FIG. 12 – ESPECTROS DE CD DA AMOSTRA Q16 0,002 MM OBTIDOS DURANTE O CICLO DE AQUECIMENTO.	18
FIG. 13 – ESPECTROS DE CD DAS POLIGLUTAMINAS AO LONGO DE 9 DIAS.	20
FIG. 14 – CURVAS DE AUTO-CORRELAÇÃO NORMALIZADAS REFERENTES AS VÁRIAS POLIGLUTAMINAS.....	21
FIG. 15 – CROMATOGRAMA DA Q8 ANTES DA PURIFICAÇÃO (ANALÍTICO)	34
FIG. 16 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA Q8 APÓS PURIFICAÇÃO (ANALÍTICO)	34
FIG. 17 – CROMATOGRAMA DA Q12 APÓS PURIFICAÇÃO. (ANALÍTICO)	35
FIG. 18 – CROMATOGRAMA DA Q12 ANTES DA PURIFICAÇÃO. (ANALÍTICO)	35
FIG. 19 – CROMATOGRAMA DA Q16 APÓS PURIFICAÇÃO (ANALÍTICO).....	35
FIG. 20 – CROMATOGRAMA DA Q16 ANTES DA PURIFICAÇÃO (ANALÍTICO).	35
FIG. 21 – ESPECTRO DE MASSA DA Q8.	35
FIG. 22 – ESPECTRO DE MASSA DA Q12	35

FIG. 23 – ESPECTRO DE MASSA DA Q16	35
---	-----------

Índice de tabelas

TABELA 1 – MÉTODO DE ELUIÇÃO UTILIZADO NA PURIFICAÇÃO DAS POLIGLUTAMINAS.....	10
TABELA 2 – MÉTODO DE ELUIÇÃO UTILIZADO NO SISTEMA DE HPLC ANALÍTICO.	10
TABELA 3 – RESULTADOS ANALÍTICOS DAS POLIGLUTAMINAS SINTETIZADAS	13
TABELA 4 – DECONVOLUÇÕES DOS ESPECTROS OBTIDOS A DIFERENTES PH'S	14
TABELA 5 – DECONVOLUÇÕES DOS ESPECTROS DA Q8 A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	16
TABELA 6 – DECONVOLUÇÕES DOS ESPECTROS DA Q12 A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	17
TABELA 7 – DECONVOLUÇÕES DOS ESPECTROS DA Q16 A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	18
TABELA 8 – DECONVOLUÇÕES DOS ESPECTROS OBTIDOS A AO LONGO DO TEMPO PARA A Q8, Q12 E Q16.....	20
TABELA 9 – FACTORES PRÉ-EXPONENCIAIS (A1, A2) E DIÂMETRO HIDRODINÂMICOS (Z1 E Z2) PARA OS DOIS TIPOS DE AGREGADOS (A1 E A2) E INTENSIDADE DE LUZ DISPERSA DE CADA AMOSTRA.	21
TABELA 10 – SUMÁRIO DOS RESULTADOS DE DICROÍSMO CIRCULAR	30

Índice de abreviaturas e símbolos

Ac - Acetilação
ACN – Acetonitrilo
Boc - t-butiloxicarbonil
CD – Dicroísmo Circular
DCM – Diclorometano
DIPEA – Diisopropiletilamina
DLS – Dispersão de Luz Dinâmica
DMF – Dimetilformamida
EMM – Elipticidade Molar Média
Fmoc – Flurenilmetoxicarbonil
HBTU - O-(Benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio hexafluorofosfato
HD - doença de Hungtinton
HFIP - Hexafluorisopropanol
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance
NMP - N-Metil-2-pirrolidona
PA – Poliamida
PEG – Poliestireno glicol
poliQ – poliglutamina
PS – Poliestireno
Q12 – Poliglutamina com 12 glutaminas
Q16 - Poliglutamina com 16 glutaminas
Q8 - Poliglutamina com 8 glutaminas
SPPS – Síntese de Pétidos em Fase Sólida
TFA – Ácido Trifluoracético
TIS – Triisopropilsilano

1. Introdução

1.1. Poliglutaminas

1.1.1. Péptidos

O grupo α -carboxilo de um aminoácido reage com o grupo α -amina do seguinte aminoácido formando uma ligação amida, também designada por ligação peptídica. Os polímeros resultantes da ligação sucessiva de vários aminoácidos são designados por péptidos ou proteínas, dependendo do número de monómeros e das suas propriedades físico-químicas.^[1,2] Apesar da hidrólise das ligações peptídicas ser uma reacção exotérmica, esta possui uma alta energia de activação. Como resultado, as ligações peptídicas são muito estáveis, tendo uma meia-vida de cerca de 7 anos em condições intracelulares.^[2] A distinção entre péptidos e proteínas não é estática e tem sido alterada ao longo do tempo. Inicialmente os péptidos e as proteínas eram distinguidos simplesmente pelo número de aminoácidos que os constituíam. Cadeias com menos de cinquenta resíduos eram designadas por péptidos, enquanto cadeias com número superior de aminoácidos eram designadas por proteínas. Actualmente designa-se por péptido uma cadeia polipeptídica com sequência definida (até 30 ou 50 aminoácidos dependendo das fontes), cujas propriedades físico-químicas são resultantes do somatório das propriedades dos resíduos de aminoácidos) que os constituem.^[1,2]

1.1.2. Glutamina e Poliglutamina

A glutamina é um dos vinte aminoácidos principais (**Fig. 1**). A cadeia lateral deste aminoácido é constituída por dois grupos metileno e um grupo amida. A cadeia lateral da glutamina é polar e ionizável, podendo funcionar como doadora e aceitadora de pontes de hidrogénio.^[1,2] Esta propriedade torna os resíduos de glutaminas mais solúveis em água devido à formação de pontes de hidrogénio com a água.^[2]

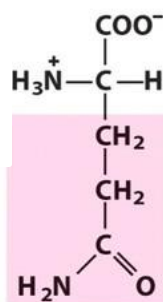


Fig. 1 – Representação do aminoácido glutamina.

De todas as repetições de aminoácidos em eucariotas, as poliglutaminas são as mais comuns.^[3] A proteína Huntingtina é uma das várias que apresenta tais repetições sendo a sua função ainda não conhecida, sabendo-se apenas que influencia o desenvolvimento embrionário.^[4] Esta proteína possui aproximadamente 3144 aminoácidos (350 kDa). No entanto

o número de resíduos glutamina não é constante e pode variar entre 6 a 35 aminoácidos.^[5] Uma mutação no gene *HD* pode aumentar o número de repetições de glutamina presente na huntingtina devido a um aumento indevido da repetição do codão CAG. Um indivíduo com esta mutação possui uma doença neurodegenerativa conhecida como doença de Huntington.^[6,7]

1.1.3. Doença de Huntington

A doença de Huntington é uma doença neurodegenerativa hereditária para a qual não existe ainda cura conhecida e que se acredita ser causada pela agregação de Huntingtina mutante.^[3,8] Apesar da estrutura e toxicidade destas proteínas mutantes não ser clara, vários estudos demonstraram que o tamanho da cadeia de poliglutaminas afecta a formação de agregados. O aumento do número de resíduos de glutamina aumenta proporcionalmente a formação de agregados.^[3, 5, 9, 10]

Este tipo de mutação não é exclusivo do gene *HD*. A doença de Kennedy, ataxia espinocerebelar tipo 1, 2, 6 e 7 e a doença de Machado-Joseph (**Fig.2**) são exemplos de doenças cujos pacientes apresentam este tipo de mutação nos respectivos genes. Cada uma destas doenças é hereditária autosomal dominante.^[10]

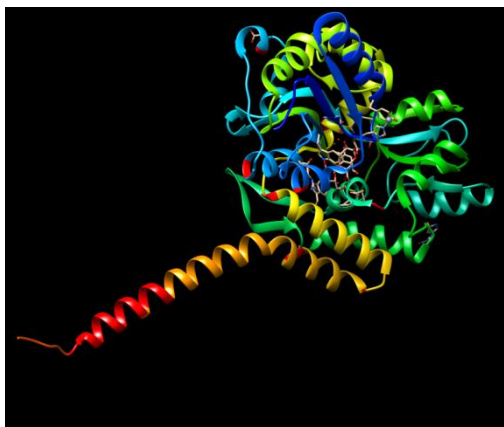


Fig. 2 – Estrutura da região terminal da proteína ataxina-3.^[11] Um mutante desta proteína está relacionado com a doença de Machado-Joseph. A vermelho estão realçados os resíduos de Gln. Código PDB: 4wth.

1.2. Síntese de Péptidos em Fase Sólida (SPPS)

A síntese de péptidos em fase sólida (SPPS - *Solid Phase Peptide Synthesis*) é um método de preparação de sequências peptídicas baseado na adição sequencial de resíduos de aminoácidos a uma matriz polimérica insolúvel (resina) através do grupo carboxílico do primeiro aminoácido (grupo C-terminal). Após remoção do grupo protector N-terminal, o próximo aminoácido da cadeia é adicionado. O péptido obtido após várias adições sequenciais encontra-se ligado covalentemente à resina e precisa de ser clivado (**Fig. 3**). Dependendo do

linker utilizado e do tipo e natureza da resina, o péptido clivado final poderá possuir um grupo carboxamida ou carboxílico no seu C-terminal, ou então um outro qualquer grupo funcional (e.g. grupo álcool). As cadeias laterais de alguns aminoácidos também se encontram protegidas por um grupo protector (PG). A combinação da resina e dos grupos protectores das cadeias laterais é normalmente escolhida de modo a que ambos sejam removidos no processo de clivagem final e isolamento do péptido.^[11] O processo de síntese utilizado neste estudo utiliza aminoácidos cuja α -amina está protegida com o grupo flurenilmetoxycarbonil (Fmoc).

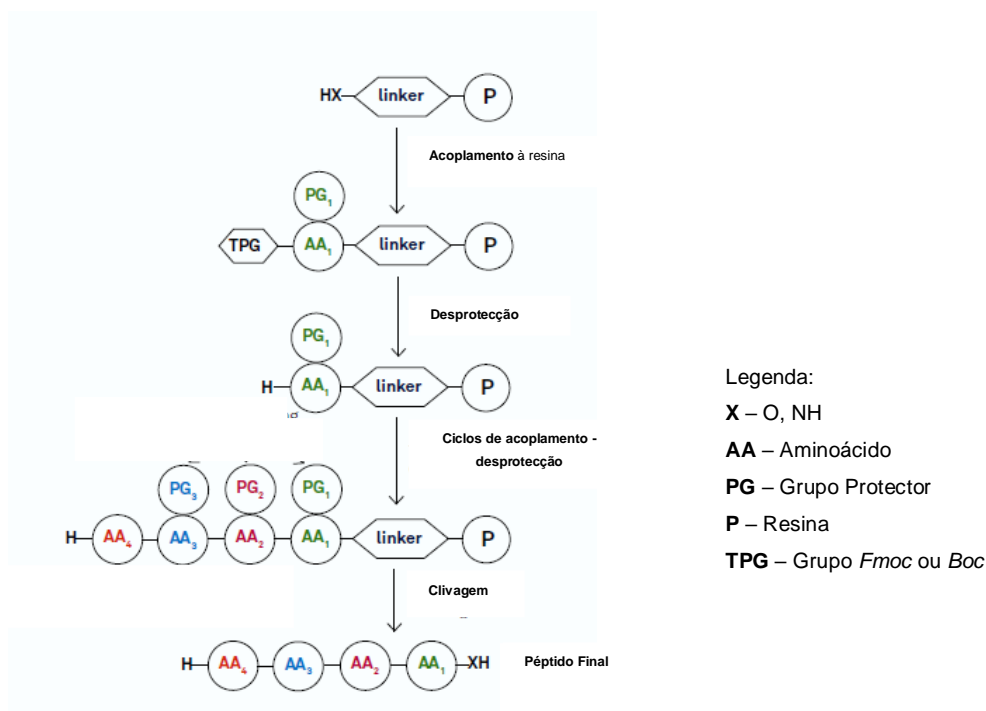


Fig. 3 – Esquema geral do processo de SPPS.

1.2.1. *Fmoc* e *Boc* SPPS

Existem duas estratégias para a SPPS, nomeadamente a que recorre à utilização de aminoácidos protegidos na α -amina com o grupo t-butiloxycarbonil (BOC) e a que recorre à utilização de aminoácidos protegidos com o grupo Fmoc designados, respectivamente, por Boc-SPPS e Fmoc-SPPS. O grupo Boc é removido por acidólise, normalmente por ácido fluorídrico (HF), enquanto que o grupo Fmoc é removido por adição de uma base tal como por exemplo a piperidina. De ambas as metodologias, a síntese com Boc foi a inicialmente mais utilizada, sendo que actualmente a mais difundida é a Fmoc-SPPS.^[12, 13] Ao contrario das sínteses com Boc, as sínteses com Fmoc não requerem a utilização de HF. Para além de ser mais seguro, esta síntese também não requer o uso de material de laboratório normalmente necessário para manusear HF, tornando-a mais fácil de automatizar.^[11, 12]

1.2.2. Resinas para SPPS

A escolha da resina a utilizar na SPPS tem que ser ponderada tendo em consideração as características esperadas para o produto final. Para a síntese de péptidos é recomendável a utilização de resinas de partículas pequenas e baixo “*cross-linking*”, o que permite que os reagentes se difundam rapidamente por entre o polímero. As características de uma resina dependem principalmente da sua composição. Poliestireno (PS), poliacrilamida (PA), polietilenoglicol (PEG) ou uma combinação destes polímeros são os materiais mais utilizados para o fabrico das resinas mais comuns.^[14]

A resina utilizada neste estudo, NovaPEG (**Fig.4**), não possui PA ou PS na sua composição, sendo composta apenas por PEG. Esta característica confere à resina uma excelente capacidade de expansão e propriedades mecânicas. Esta resina é estável ao choque osmótico que se verifica quando o solvente é trocado de hidrofóbico para hidrofílico e possui excelente estabilidade química quando exposta a ácidos fortes e bases.^[15] A sua natureza anfifílica torna esta resina excelente como suporte para a síntese de péptidos que têm tendência a formar agregados. A síntese de um segmento da β -amilóide utilizando a resina NovaPEG levou à obtenção de um produto com uma pureza inicial de 91% com procedimentos simples.^[15] Esta sequência é difícil de sintetizar devido à sua tendência para agregar. Por comparação, a síntese deste mesmo péptido com resinas PS ou PS-PEG requereu estratégias mais complexas e demoradas.^[15]

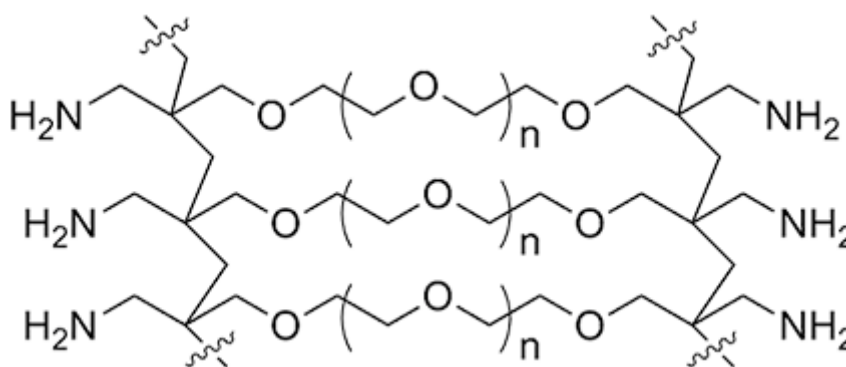


Fig. 4 – Polímero de polietilenoglicol.

1.3. Dicroísmo Circular

Dicroísmo Circular (CD – *Circular Dichroism*) é um método espectrofotométrico que aproveita o facto de moléculas quirais (ou em meios quirais) interagirem diferentemente com luz polarizada circularmente à esquerda e à direita.^[16] O espectro de CD é extremamente sensível às características tridimensionais das moléculas quirais. Como a vasta maioria das moléculas biológicas são quirais, esta técnica possui várias aplicações em bioquímica. Através

do espectro de CD é possível verificar, por exemplo, a estrutura secundária de um péptido ou a conformação das moléculas de DNA.^[16]

A estrutura secundária da poli-L-lisina, um homopolímero, pode ser controlada experimentalmente.^[17] Espectros de CD, entre os 190 nm – 250 nm, das três diferentes formas da poli-L-lisina, têm sido utilizados como referência das três principais estruturas. Os espectros de CD para diferentes estruturas secundárias de poli-L-lisina estão representados na **Fig. 5**. Estes espectros foram utilizados neste trabalho para o cálculo aproximado da fracção de cada estrutura secundária na mistura em solução.

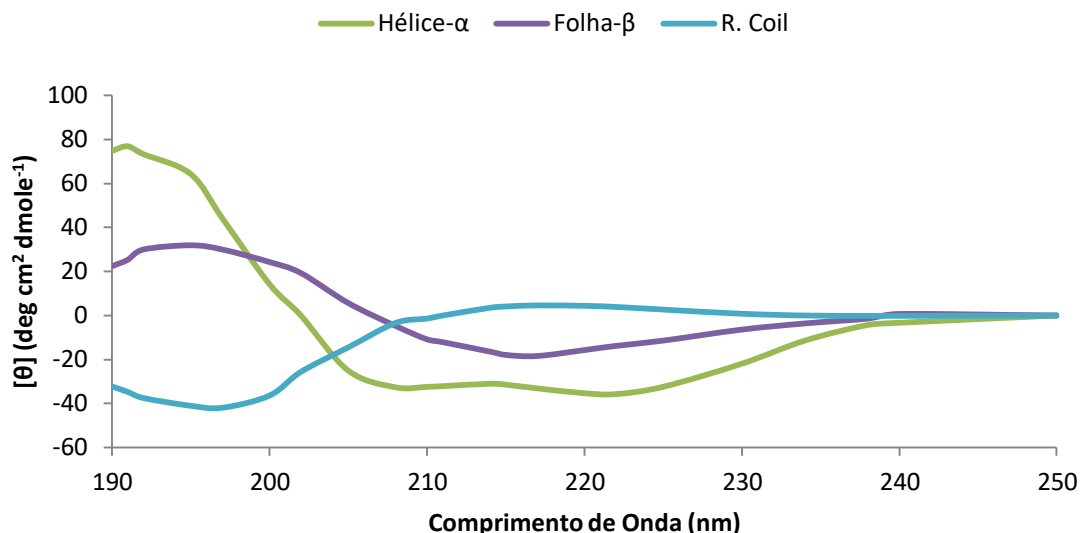


Fig. 5 – Espectro de dicroísmo circular da poli-L-lisina nas três principais conformações.^[17]

Segundo estudos publicados, os espectros de CD de poliglutaminas, **Fig. 6**, revelam que os péptidos não possuem estrutura definida na sua forma monomérica.^[18,19] O aumento da cadeia de glutaminas aumenta a formação da estrutura secundária em folha-β.^[19]

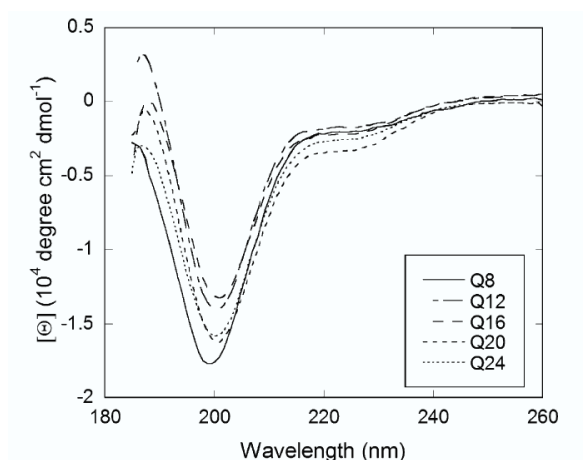


Fig. 6 – Espectro de CD de vários péptidos com diferente número de poliglutaminas.^[18] Resultados das amostras apresentadas a 20 μM, pH 7,4 e filtradas.

1.4. Dispersão de Luz Dinâmica

Ao analisar a luz dispersada por partículas pequenas, pode medir-se o seu movimento (coeficiente de difusão) e o tamanho médio pode ser estimado a partir da equação de Stokes-Einstein, usando as aproximações necessárias.^[20] A dispersão de Luz Dinâmica (DLS – *Dynamic Light Scattering*) é um método de análise que consiste em incidir um feixe de luz monocromático numa solução com partículas em suspensão. Quando a luz incide na amostra irá ser dispersa de forma proporcional ao número de partículas presentes no volume observado. Como o número de partículas varia com o tempo, a intensidade de luz dispersa flutua também em função do tempo. Dessa flutuação constroi-se a chamada curva de autocorrelação em função do tempo de correlação. Da relaxação exponencial calcula-se de seguida o coeficiente de difusão e consequentemente o tamanho das partículas.^[21,22] DLS é um dos métodos mais difundidos de determinação do tamanho de partículas devido às suas variadas vantagens, tais como por exemplo análises rápidas, simples e não invasivas.^[20-22]

A dispersão de luz é um método excelente para verificar se as proteínas se encontram na sua conformação nativa, em monómeros ou dímeros ou até em agregados de maiores dimensões.^[18] Assim sendo, a técnica de DLS é uma ferramenta indispensável para o estudo da agregação de polímeros com tendência a agregar tais como as poliglutaminas. Estudos cinéticos com péptidos semelhantes aos deste trabalho mostraram que a velocidade de agregação aumenta exponencialmente com o aumento do comprimento da cadeia de poliglutaminas,^[18] podendo o raio hidrodinâmico dos agregados ultrapassar os 100 nm para concentrações de 20 μM .^[18]

1.5. Objectivos

A identificação das características físico-químicas de agregados de proteínas e da sua formação pode esclarecer questões importantes na etiologia e tratamento de doenças onde esse tipo de fenómeno é relevante. Esta Tese de mestrado teve como principal objectivo o estudo do processo de agregação de sequências peptídicas com um número variável e controlado de resíduos glutamina em diferentes condições de temperatura e pH, bem como a análise estrutural dos agregados formados.

Para se alcançar esse objectivo, proceder-se-á numa primeira fase à síntese, purificação (pureza > 95 %) e caracterização de uma família de péptidos com número variável de resíduos glutamina. De seguida, os péptidos serão estudados em solução aquosa por CD e DLS a várias condições de temperatura e pH. Desta forma será possível estudar a formação de agregados e relacionar as suas alterações estruturais com as variações no ambiente em que se encontram.

2. Materiais

2.1. Síntese de péptidos e purificação

A síntese, purificação e caracterização das sequências poliglutamina foram realizados no grupo de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN) do Instituto Superior Técnico (IST), Universidade de Lisboa.

2.1.1. Síntese

Os péptidos utilizados neste trabalho foram sintetizados por Fmoc-SPPS num sintetizador automático de péptidos em fase sólida assistido por micro-ondas da marca *CEM Liberty*. A resina utilizada foi a *NovaPEG Rink Amide resin* (substituição molar = 0,45 meq/g) (855047), *Novabiochem*[®]. Os aminoácidos Fmoc-Ala-OH (852060), Fmoc-Gln(Trt)-OH (852009), Fmoc-Lys(Boc)-OH (852023) e Fmoc-Trp(Boc)-OH (852207) foram adquiridos à *Novabiochem*[®], assim como o activador O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio hexafluorofosfato (HBTU) (≥99%) (851006). A base activadora diisopropiletilamina (DIPEA) (99,5%) (387649 *SIGMA-ALDRICH*), piperidina (≥99,5%) (411027 *ALDRICH*), anidro acético (≥98%) (242845 *SIGMA-ALDRICH*) e triisopropilsilano (TIS) (98%) (233781 *ALDRICH*) foram adquiridos ao grupo *SIGMA-ALDRICH*[®]. O solvente Dimetilformamida (DMF) (P0340211) é da marca *CARLO ERBA REAGENTS*[®]. Os restantes solventes N-metil-2-pirrolidona (NMP) (≥98%) (443778-M *EMD MILLIPORE*), diclorometano (DCM) (anidro, ≥99,8%) (270997 *SIGMA-ALDRICH*) ácido trifluoracético (TFA) (8.08260 *EMD MILLIPORE*) e hexafluoro-2-propanol (HFIP) (≥99%) (105228 *ALDRICH*) foram adquiridos à *SIGMA-ALDRICH*[®].

2.1.2. Purificação

A purificação dos péptidos sintetizados foi realizada por Cromatografia Líquida de alta Performance (HPLC). O sistema de HPLC utilizado na purificação era composto pelo sistema *Waters 2535 Quaternary Gradient Module* e *Waters 2998 Photodiode Array Detector*. A coluna semi-preparativa utilizada na purificação foi uma *Supelco Analytical 567209-U* (C₁₈, 25 cm x 10 mm, 10 µm, *SIGMA-ALDRICH*[®]). As fracções recolhidas foram controlados por HPLC e analisadas espectrometria de massa.

O sistema de HPLC analítico utilizado era um *PerkinElmer*[®] *Series 200 pump* em conjunto com *PerkinElmer*[®] *Series 200 UV/Vis Detector*. Neste sistema utilizou-se uma coluna *Supelco Analytical 568223-U* (C₁₈, 25 cm x 4,6 mm, 5 µm, *SIGMA-ALDRICH*[®]). Para a caracterização por espectrometria de massa (ESI-MS) foi utilizado o equipamento *ESI/QITMS*. O solvente acetonitrilo (ACN) (P006S03/21) utilizado na purificação era da marca *CARLO ERBA REAGENTS*[®].

2.2. Dicroísmo Circular

O estudo de dicroísmo circular foi executado no espectrofotómetro *Chirascan qCD*, *Paralab*, acoplado com controlador de temperatura TC125, *QUANTUM NORTHWEST*. Estes aparelhos foram disponibilizados pelo grupo BioLab, FCT/UNL. As células de quartzo utilizadas neste trabalho foram disponibilizadas por este mesmo grupo.

2.3. Dispersão de Luz Dinâmica

A determinação do tamanho das partículas foi realizada no espectrofotómetro *nanopartica SZ-100 series* (*HORIBA Scientific®*). Estes equipamentos pertencem ao grupo de Fotoquímica e Química Supramolecular da Faculdade de Ciências de Tecnologias / Universidade NOVA de Lisboa (FCT/UNL).

2.4. Preparação das amostras

As amostras foram pesadas numa balança *Sartorius Research R200D*. O pH foi controlado utilizando um medidor de pH do tipo *CRISON pH-Meter BASIC 20+*.

A quantificação das poliglutaminas em solução foi realizada no espectrofotómetro *Cary 5000 UV-Vis-NIR* (*Varian®*).

3. Procedimento Experimental

3.1.1. *Síntese de péptidos em fase sólida*

3.1.2. *Síntese automatizada*

Neste trabalho foram sintetizadas três sequências peptídicas distintas. Todas apresentam aminoácidos iguais nas extremidades C- e N-terminal, apenas variando o número de resíduos de glutamina inseridos na parte central. Os péptidos sintetizados apresentam a seguinte sequência geral: Ac-K₂WQ_nAK₂-NH₂, onde n = 8, 12 ou 16 (Q8, Q12 e Q16, respectivamente).

A síntese peptídica, excluindo a clivagem e desprotecção dos grupos laterais, foi realizada automaticamente utilizando o sistema automático *CEM Liberty* mencionado anteriormente. Os ciclos de acoplamento foram selecionados em função das características de cada aminoácido. O aminoácido Ala e as quatro Lys presentes na estrutura primária das poliglutaminas foram conjugados utilizando-se um ciclo simples, existente por defeito no Software de controlo do sintetizador, e acetilação das aminas livres no final do processo. O processo de acetilação evita a formação de cadeias truncadas.

Os aminoácidos Trp e todas as Gln foram acoplados com um duplo ciclo longo com acetilação no final do segundo ciclo.

O processo de SPPS foi automático até ao passo da desprotecção da amina terminal da última lisina adicionada. Os passos de clivagem e desprotecção de grupos laterais foram realizados manualmente num reactor de péptidos com uma placa porosa no seu interior. Antes da clivagem, a resina contendo o péptido foi lavada repetidamente (4 vezes) com DMF, e no final com DCM. A clivagem foi realizada com 10 mL da solução 95% TFA / 2,5% TIS / 2,5% H₂O.^[12] A mistura da resina e solução de clivagem foi agitada suavemente com corrente ascendente de azoto durante 4h.

No final da clivagem o solvente foi recuperado e a resina lavada com DCM. O solvente resultante da lavagem foi adicionado ao solvente inicialmente recolhido. Esta solução foi concentrada sob uma corrente de azoto para facilitar a precipitação. Os péptidos foram precipitados por adição de éter etílico frio e centrifugados a 2000 rpm durante 10 min. O sólido obtido foi lavado mais duas vezes com éter etílico e isolado e recolhido por centrifugação.

3.1.3. *Preparação das amostras para HPLC*

O precipitado foi dissolvido em 0,01% TFA aq. e a solução liofilizada. O liofilizado foi dissolvido em 2-3 mL de solução HFIP/TFA 1:1, a solução resultante esteve sob agitação constante por 12 h. Ao fim deste período, o solvente foi evaporado por corrente até se obter um resíduo sólido.

3.1.4. Purificação por HPLC

O sólido obtido foi dissolvido numa solução aquosa com 0,01% TFA e posteriormente filtrado com um filtro de 0,45 μm . A solução filtrada foi purificada utilizando o método de eluição apresentado na **Tabela 1** e **Fig. 7**.

As fracções obtidas da purificação foram analisadas por um sistema de HPLC analítico e espectrometria de massa. O método de eluição utilizado pelo sistema de HPLC analítico encontra-se representado na **Tabela 2** e **Fig. 8**.

O ACN presente nas fracções purificadas foi evaporado sob uma corrente de azoto. As fracções foram subsequentemente liofilizadas.

Tabela 1 – Método de eluição utilizado na purificação das poliglutaminas. Solventes: A – 0,1% TFA aq.; B – 0,1% TFA/ACN.

Tempo (min)	A(%)	B(%)
0	90	10
5	90	10
25	45	55
27	0	100
28	0	100
30	90	10

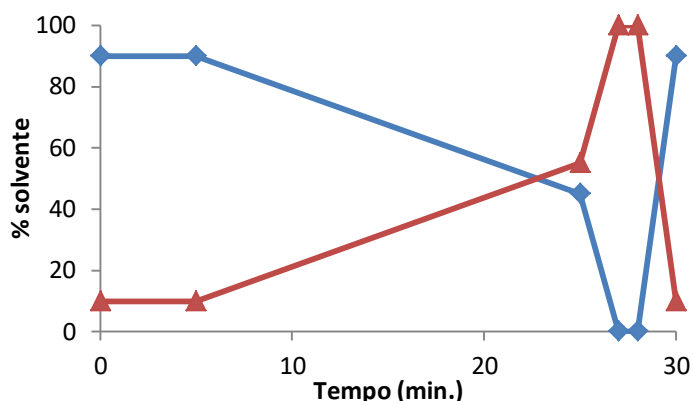


Fig. 7 – Representação gráfica do método de eluição utilizado na etapa de purificação. Vermelho: 0,1% TFA aq. (A); Azul: 0,1% TFA/ACN (B); Fluxo de 3 mL/min. $\lambda = 220$ e 280 nm.

Tabela 2 – Método de eluição utilizado no sistema de HPLC analítico. Solventes: A – 0,1% TFA aq.; B – 0,1% TFA/ACN.

Tempo (min)	A(%)	B(%)
0	90	10
5	90	10
25	70	30
27	70	30
28	0	100
29	0	100
30	90	10

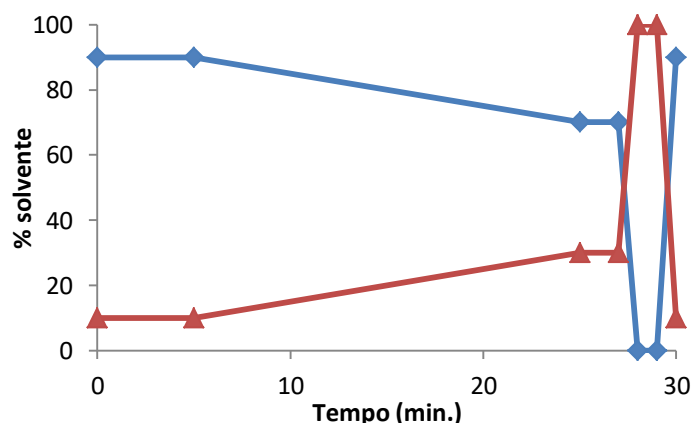


Fig. 8 – Representação gráfica do método de eluição utilizado no sistema de HPLC analítico. Vermelho: 0,1% TFA aq. (A); Azul: 0,1% TFA/ACN (B); Fluxo de 1 ml/min. $\lambda = 220$ nm

3.1.5. Determinação da concentração

As poliglutaminas purificadas foram dissolvidas em 0,01% TFA aq. e a sua concentração determinada por espectroscopia de UV-Vis. A concentração das amostras foi calculada utilizando o coeficiente de extinção do triptofano ($\epsilon_{280\text{nm}} = 5500 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). As amostras de poliglutaminas foram congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C .

3.2. Estudo Estrutural das poliglutaminas e agregados

O estudo estrutural dos péptidos Q8, Q12 e Q16 foi realizado por CD na região entre os 190 nm e os 290 nm. Neste intervalo é possível recolher informação sobre a estrutura secundária dos péptidos e seus agregados.^[18,19] De modo a evidenciar as características tanto dos péptidos como dos agregados, estes foram estudados a diferentes pHs e temperaturas.

3.2.1. Estudo da variação estrutural das poliglutaminas com o pH

O comportamento das soluções de poliglutaminas foi estudado a 5 valores de pH distintos: 5, 6, 7, 8 e 9. Prepararam-se soluções 0,2 mM das três soluções de poliQ's. As poliglutaminas foram previamente dissolvidas em TFA 0,01% aq.. Esta solução é naturalmente ácida ($\text{pH} < 3$). Com o auxílio de uma micropipeta foi adicionado quantidades controladas de NaOH 1M de modo a que a concentração de poliglutaminas não varie significativamente. Quando a solução atinge o valor de pH desejado, uma alíquota de 200 μL é retirada para análise. As alíquotas ficaram em repouso por uma hora antes da aquisição de dados. Os espectros de CD para as diferentes gamas de pH foram obtidos a 20°C numa célula de quartzo com 0,02 cm de comprimento.

3.2.2. Estudo da variação estrutural das poliglutaminas com a temperatura

Prepararam-se soluções com 0,002 mM e pH 7 para os 3 péptidos estudados. O pH das amostras foi corrigido pelo mesmo método usado no estudo anterior. Neste estudo o pH das soluções manteve-se constante mas variou-se a temperatura. Foram recolhidos espectros a 20°C , 30°C , 40°C , 50°C , 60°C , 70°C e 80°C . Para cada temperatura deixou-se a amostra estabilizar durante 10 min. antes de obter o espectro. Aos 80°C , mediu-se a temperatura durante 50 min. de modo a verificar a estabilidade da estrutura.

Após se verificar que a estrutura era estável a 80°C , realizou-se um ciclo análogo ao anterior obtendo espectros referentes às temperaturas de 40°C e 20°C . Aos 20°C voltou-se a verificar se haveria mudanças estruturais significativas durante 50 min.

Este estudo foi repetido para as três diferentes poliglutaminas. Todos os dados referentes a este estudo foram adquiridos numa célula de quartzo com 10 mm de comprimento.

3.2.3. Avaliação da cinética estrutural ao longo do tempo

Foram preparadas soluções de concentração 0,002 mM das poliglutaminas Q8, Q12 e Q16. Estas foram aquecidas em banho de água até aos 80°C. Após 1 hora a 80°C, as amostras foram retiradas do banho e deixadas a arrefecer até atingirem a temperatura ambiente. Espectros de CD foram obtidos para as três soluções a 20°C. Os espectros foram obtidos 0, 24, 48, 120, 168 e 216 horas após terem atingido a temperatura ambiente. Entre análises, as soluções foram guardadas numa sala de temperatura controlada (19°C) e protegidas da radiação solar.

3.3. Estudo do tamanho de partículas por DLS

Todas as análises por DLS foram realizadas com o ângulo de dispersão a 90° e um laser com comprimento de onda de 532 nm. A partir das soluções de concentração conhecida foram preparadas soluções com 0,2 mM para cada poliglutamina. O pH das amostras utilizadas foi cuidadosamente ajustado para 7 com uma solução concentrada de NaOH de modo a não alterar a concentração das soluções. As análises de DLS foram realizadas a 20°C para as três poliglutaminas.

4. Resultados

4.1. Síntese e Purificação

As três sequências peptídicas contendo número variável de poliglutaminas, Ac-K₂WQ_nAK₂-NH₂ (n = 8, Q8; n = 12, Q12; n = 16, Q16), foram sintetizadas em fase sólida (SPPS) num sintetizador automático de péptidos assistido por micro-ondas *CEM Liberty* de forma sequencial.

Neste estudo as três poliglutaminas Q8, Q12 e Q16 foram purificadas até uma pureza ≥ 98% (determinada por HPLC analítico, e um teor em péptido da ordem dos 67,87%, 56,18% e 52,25% para a Q8, Q12 e Q16 respectivamente, calculado por espectrofotometria de ultravioleta-visível). A diferença para os 100% corresponde à presença de moléculas de água e potenciais contra-íões como por exemplo o ião trifluoroacetato.

Obtiveram-se 29,10 mg (Q8), 14,08 mg (Q12) e 10,08 mg (Q16) de produto final após purificação. Assim sendo, o rendimento de cada síntese foi de 15,7% para a Q8, 6,0% para a Q12 e 3,5% para a Q16.

Os resultados da caracterização por espectrometria de massa (ESI-MS), bem como os respectivos tempos de retenção no sistema de HPLC analítico são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Resultados analíticos das poliglutaminas sintetizadas (tempos de retenção apresentados para o sistema analítico)

Composto	Peso Molecular (Da)	M/z (Da) [ião]	Fórmula Molecular	Tempo Retenção (min.)
Ac-K ₂ WQ ₈ AK ₂ -NH ₂	1885,02	928,1 [M+2H] ²⁺	C ₈₀ H ₁₃₂ N ₂₈ O ₂₃	9,60
Ac-K ₂ WQ ₁₂ AK ₂ -NH ₂	2367,57	2368,7 [M+H] ⁺	C ₁₀₀ H ₁₆₄ N ₃₆ O ₃₁	9,60
Ac-K ₂ WQ ₁₆ AK ₂ -NH ₂	2880,09	1441,8 [M+2H] ²⁺	C ₁₂₀ H ₁₉₆ N ₄₄ O ₃₉	8,30

4.2. Dicroísmo Circular

4.2.1. Estudo estrutural dos agregados de poliglutaminas a diferentes pH's.

Neste estudo foram analisadas amostras de soluções das três poliglutaminas por CD numa gama de pH's entre 5 e 9. As poliglutaminas foram estudadas em concentrações de 0,2 mM numa célula com 0,02 cm de espessura. Os resultados deste ensaio estão apresentados na **Tabela 4**. e **Fig. 9**. Neste estudo foram utilizadas amostras frescas, ou seja, imediatamente obtidas após purificação. Os espectros de CD foram recolhidos entre os 190 nm e os 260 nm.

As três amostras mostram mudanças no sinal a diferentes pH's. A análise preliminar do sinal da amostra Q8 mostra uma desorganização quase total da estrutura. A Q8 apresenta

Tabela 4 – Deconvoluções dos espectros obtidos a diferentes pH's. Frações das três principais estruturas secundárias para cada valor de pH e poliglutamina.

Q8	5	6	7	8	9
Hélice- α	0,22	0,22	0,23	0,23	0,23
Folha- β	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
R. Coil	0,78	0,78	0,77	0,77	0,77
Q12	5	6	7	8	9
Hélice- α	0,28	0,31	0,33	0,36	0,39
Folha- β	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
R. Coil	0,72	0,69	0,67	0,64	0,61
Q16	5	6	7	8	9
Hélice- α	0,29	0,16	<0,01	<0,01	<0,01
Folha- β	0,71	0,84	>0,99	>0,99	>0,99
R. Coil	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01

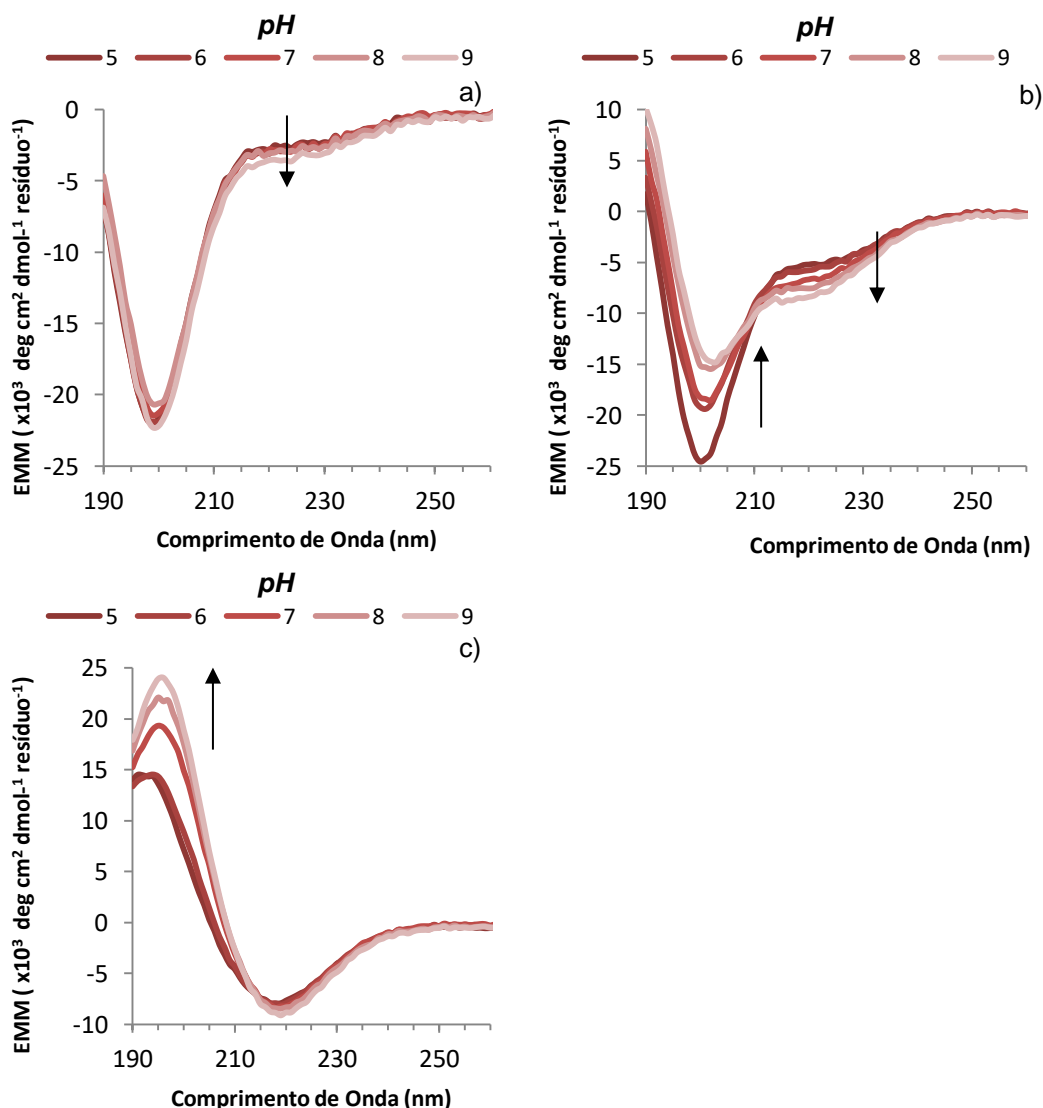


Fig. 9 – Espectros de CD das poliglutaminas a diferentes pH's. A concentração de poliglutaminas usada foi de 0,2 mM. Os espectros presentes são referentes as amostras Q8 (a), Q12 (b) e Q16 (c). As setas mostram o movimento do sinal com o aumento do pH.

um sinal estável para os vários valores de pH (**Fig. 9a**). O ligeiro aumento do sinal aos 200 nm e a diminuição na gama dos 210-230 nm mostra que à medida que o pH sobe, aumenta também a fracção de estrutura ordenada do péptido. Por análise directa do sinal não é possível determinar se a estrutura ordenada representa hélice- α ou folha- β . Os resultados da deconvolução do sinal revela que estamos numa transição pouco significativa (~1%) entre estrutura desordenada e a conformação de hélice- α , sendo que a presença de folha- β é nula ou quase nula (**Tabela 4**).

O comportamento da Q12 segue o mesmo padrão da Q8 com o aumento do pH. No entanto, a variação do sinal é significativamente maior. Variações mais intensas verificam-se na transição entre os pH's 5-6 e 7-8 (**Fig.9b**). Em comparação com a Q8, a Q12 mostra uma maior tendência para adquirir a conformação de hélice- α (**Tabela 4**). A pH 9, aproximadamente 39% da poliglutamina encontra-se em conformação hélice- α .

A Q16 distingue-se das outras poliglutaminas por não apresentar um pico negativo aos 200 nm. No entanto, esta continua a seguir o mesmo desenvolvimento com o aumento do pH que as amostras anteriores (**Fig.9c**). A pH's mais ácidos, a Q16 não mostra indícios de possuir áreas de estrutura desordenada. Com o aumento do pH, verificamos um desvio do pico máximo e do ponto de elipticidade nula para comprimentos de onda maiores. Considerando apenas as três estruturas principais, este cenário enquadra-se melhor numa transição de hélice- α para folha- β . Os resultados das deconvoluções apoiam esta hipótese (**Tabela 4**). A partir de pH 7, a conformação de folha- β domina, quase na totalidade, a estrutura do péptido.

4.2.2. Efeito da temperatura na estrutura secundaria

Neste estudo as amostras de poliglutaminas foram expostas a diferentes temperaturas. Foram utilizadas amostras com concentração 0,002 mM a pH 7 obtidas a partir de uma solução de stock (0,4 mM). Os espectros foram obtidos numa célula de quartzo com 10 mm de percurso óptico. Cada amostra foi exposta a dois ciclos de temperatura sequenciais. O primeiro ciclo foi ascendente, começando nos 20°C e acabando nos 80°C. O segundo foi descendente, de 80°C, 40°C e 20°C. Esta experiência foi repetida para cada uma das três poliglutaminas. Os resultados obtidos estão representados nas **Tabelas 5 – 7** e **Fig. 10 – Fig. 12**.

Semelhante ao ensaio a diferentes pH's (**Fig.9**), o sinal da Q8 mostra uma variação mínima (**Fig. 10**). O comportamento da amostra com o aumento de temperatura (**Fig. 10a**) é semelhante ao do aumento do pH (**Fig. 9a**), o que indica uma transição estrutural idêntica. Durante o ciclo decrescente, o sinal mostra um aumento na gama dos 210-230 nm e uma diminuição aos 200 nm (**Fig. 10b**) retomando aos 20°C o sinal inicial (**Fig.10c**).

A Q12 mostra sinais de envelhecimento (**Fig. 11a**) quando comparada com o mesmo espectro obtido a pH 7 (**Fig. 9b**). Por “envelhecimento” entende-se indícios da conformação folha- β , e expectáveis agregados. A temperaturas mais baixas, o sinal da Q12 é comparável ao obtido para a Q16 (pH 7) (**Fig.9c**), cuja estrutura é maioritariamente folha- β (**Tabela 4**). Ao

Tabela 5 – Deconvoluções dos espectros da Q8 a diferentes temperaturas. Frações das três principais estruturas secundárias para cada temperatura.

Temp. (°C)	20	30	40	50	80 (0 min.)
Hélice-α	0,20	0,20	0,21	0,22	0,22
Folha-β	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
R. Coil	0,80	0,80	0,79	0,78	0,78
Temp. (°C)	80 (50 min.)	40	20		
Hélice-α	0,22	0,21	0,20		
Folha-β	<0,01	<0,01	<0,01		
R. Coil	0,78	0,79	0,80		

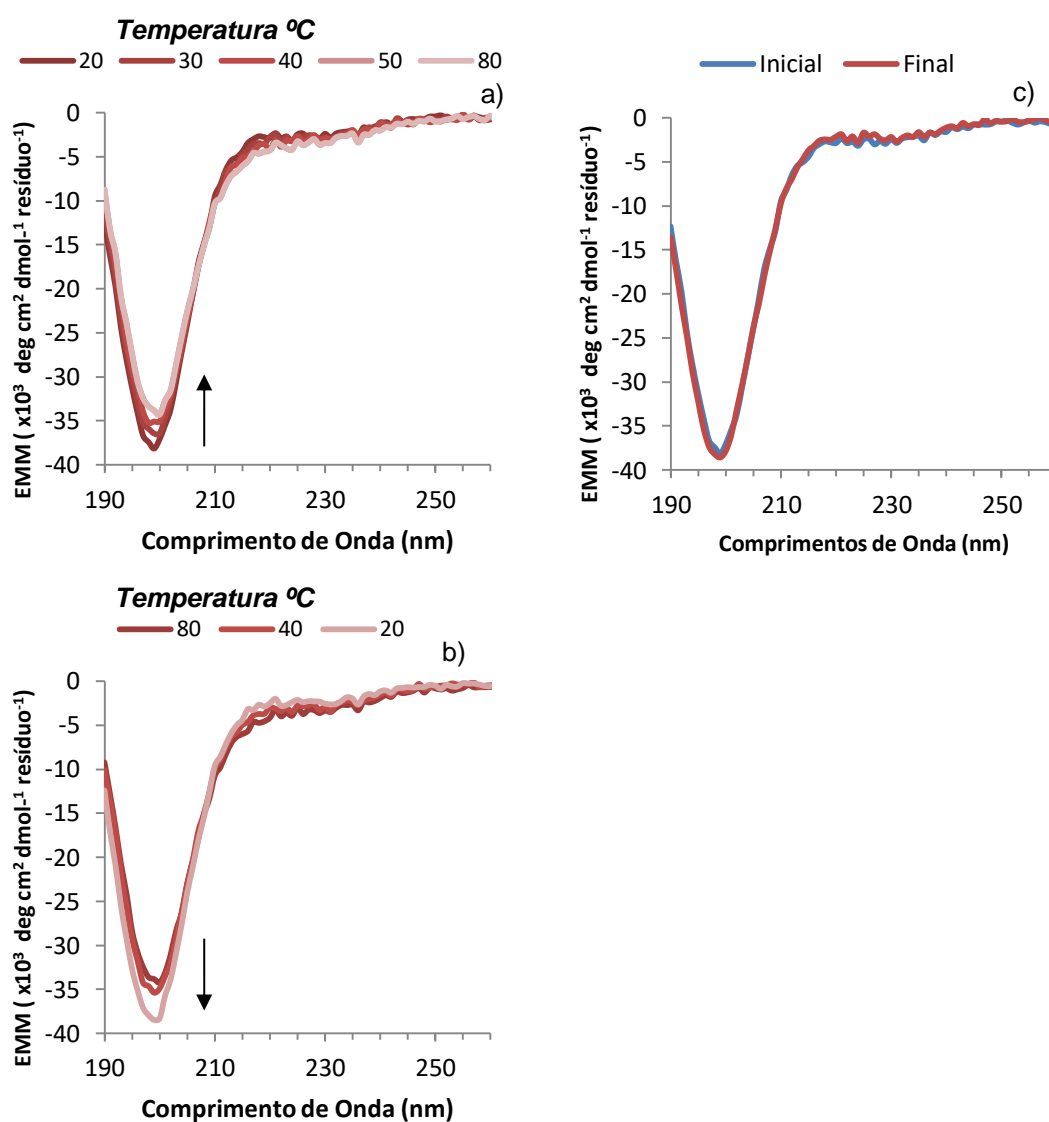


Fig. 10 – Espectros de CD da amostra Q8 a diferentes temperaturas. Os espectros a) e b) mostram a fase ascendente e descendente do ciclo de aquecimento, respectivamente. No espectro c) podemos comparar os diferentes espectros de 20°C ao início e no final no ciclo. Foi utilizada uma concentração de 0.002 mM da solução de Q8.

Tabela 6 – Deconvoluções dos espectros da Q12 a diferentes temperaturas. Frações das três principais estruturas secundárias para cada temperatura.

Temp. (°C)	20	30	40	50	80 (0 min.)
Hélice-α	0,20	0,19	0,19	0,21	0,31
Folha-β	0,69	0,70	0,69	0,57	0,05
R. Coil	0,11	0,11	0,12	0,22	0,64

Temp. (°C)	80 (50 min.)	40	20
Hélice-α	0,29	0,28	0,27
Folha-β	<0,01	<0,01	<0,01
R. Coil	0,71	0,72	0,73

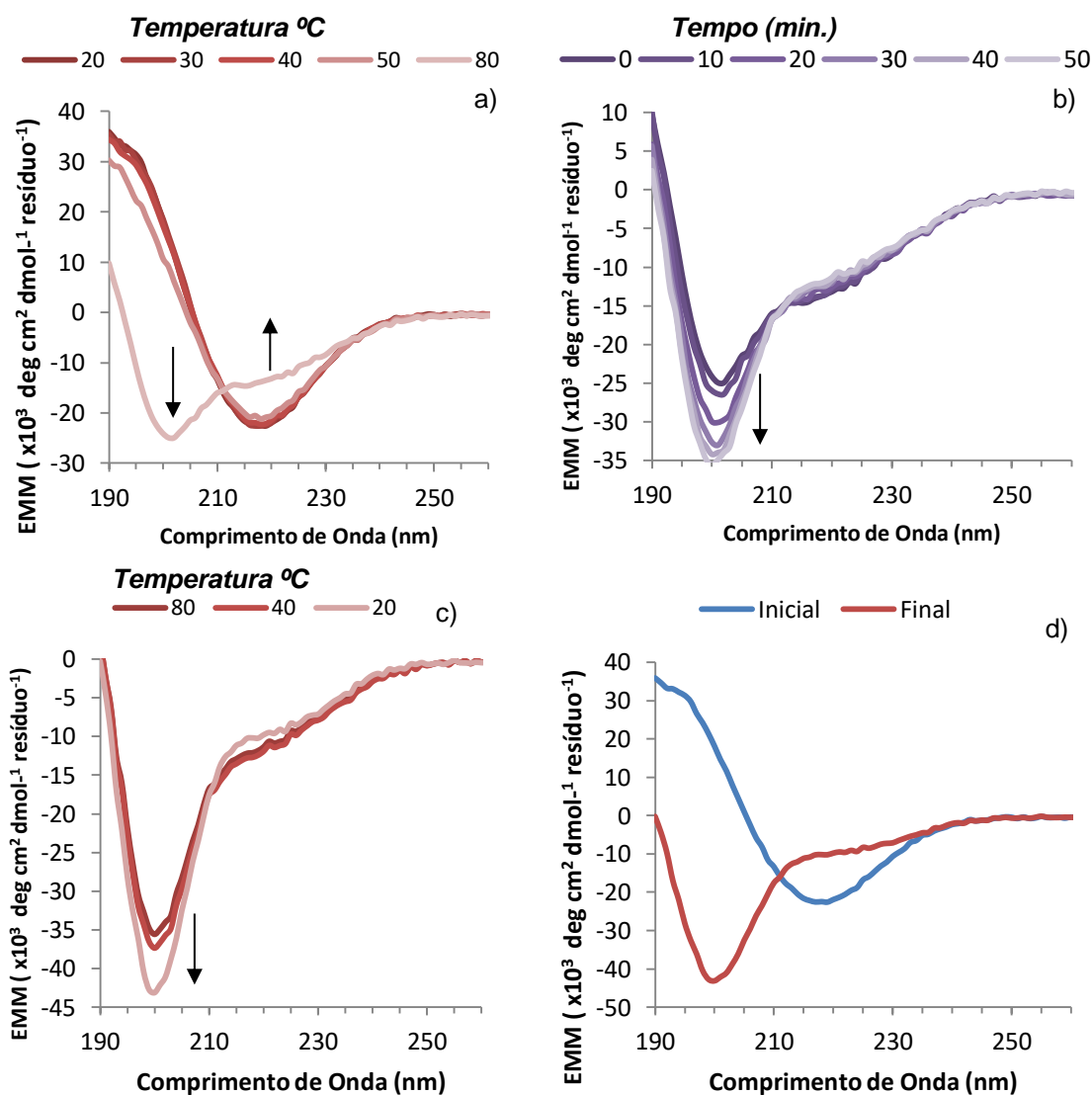


Fig. 11 – Espectros do péptido Q12 durante o ciclo de aquecimento. A concentração da amostra analisada foi 0.002 mM. As fase ascendente e descendente dos ciclos estão representadas nos espectros a) e c), respectivamente. O sinal a 80°C apenas estabilizou após 50 min. (b). No espectro d) estão representados os resultados de CD para 20°C antes e após o ciclo de aquecimento.

Tabela 7 – Deconvoluções dos espectros da Q16 a diferentes temperaturas. Frações das três principais estruturas secundárias para cada temperatura.

<i>Temp. (°C)</i>	20	30	40	50	80 (0 min.)
Hélice-α	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,07
Folha-β	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99	0,93
R. Coil	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
<i>Temp. (°C)</i>	80 (50 min.)	40	20		
Hélice-α	0,19	0,24	0,24		
Folha-β	0,64	0,55	0,56		
R. Coil	0,17	0,21	0,20		

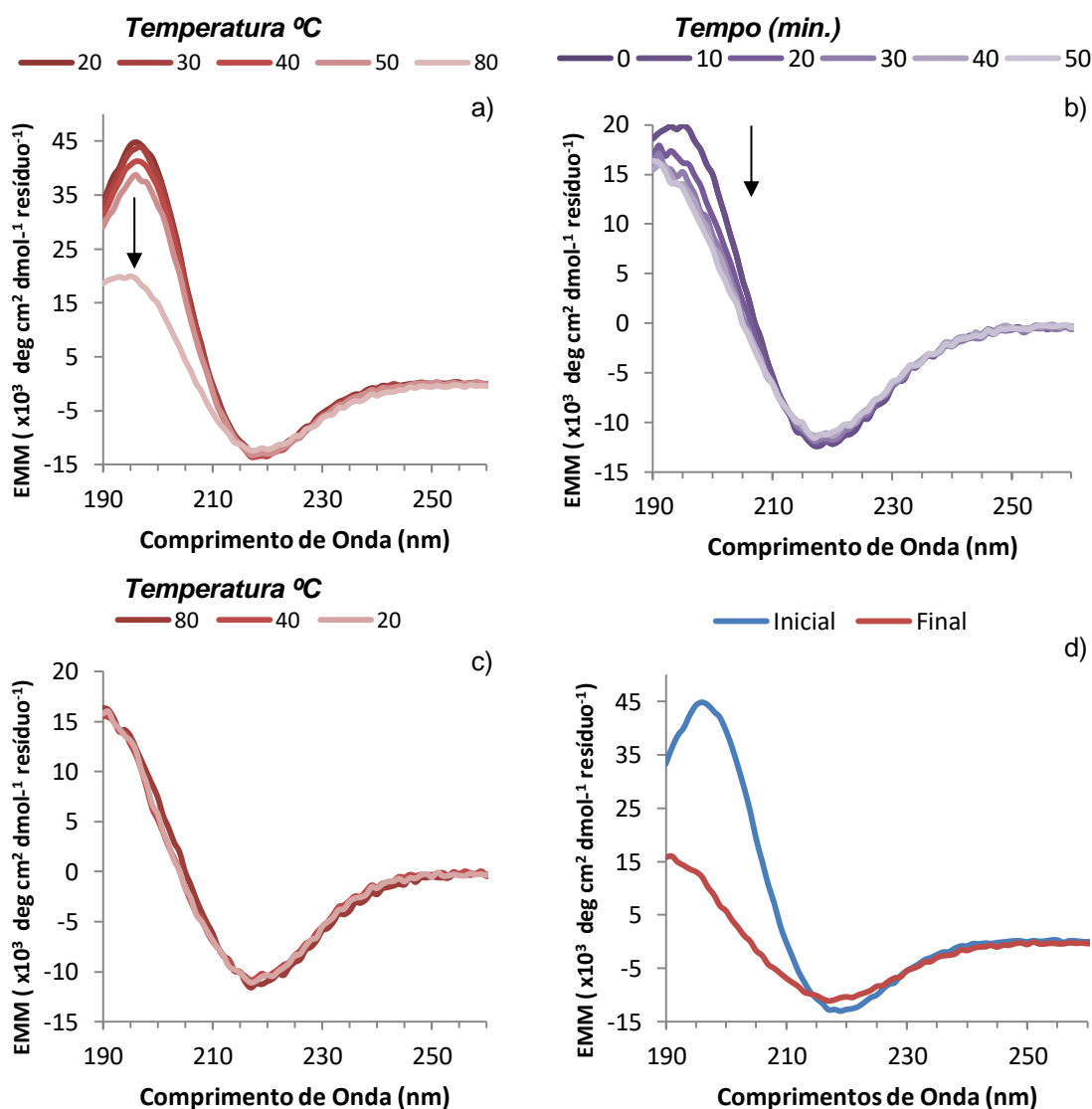


Fig. 12 – Espectros de CD da amostra Q16 0,002 mM obtidos durante o ciclo de aquecimento. O ciclo consistiu numa fase acendente (a) e noutra descendente (c). O sinal a 80°C estabilizou em aproximadamente 30 min. (b). No espectro c) estão representados os dados recolhidos da Q16 a 20°C.

aumentar a temperatura até aos 40°C não são visíveis mudanças significativas. A partir dos 50°C é possível verificar uma pequena diminuição da fracção de folha- β (**Tabela 6**). Aos 80°C temos uma transição quase completa da estrutura folha- β para hélice- α e estrutura desordenada. Às temperaturas de 60°C e 70°C não foi possível obter um sinal estável, por isso os resultados não são apresentados. Aos 80°C o sinal aparentava estabilizar inicialmente. No entanto, a observação do sinal nos 50 min. seguintes (**Fig. 11b**) revelou que a estrutura continuava em transição até estabilizar ao fim desse tempo. Durante este período, as quantidades remanescentes de folha- β perderam a sua conformação (**Tabela 6**). Durante o ciclo descendente (**Fig. 11c**), podemos observar uma desorganização da estrutura restante com a diminuição da temperatura. Ao comparar os espectros a 20°C de ambos os ciclos (**Fig. 11d**) podemos verificar um desaparecimento quase total da estrutura folha- β . Aos 20°C finais, o espectro da amostra Q12 assemelha-se ao espectro para a mesma amostra no ensaio a diferentes pH's (**Fig. 9b**).

Inicialmente, a Q16 (**Fig. 12a**) mantém um sinal semelhante ao obtido no estudo anterior (**Fig. 9c**). Esta amostra possui um sinal praticamente estável até aos 80°C. Tal como com a Q12 não foi possível estabilizar o sinal aos 60°C e 70°C. Aos 80°C observamos uma diminuição do sinal aos 200 nm, no entanto, o sinal na gama 210-230 nm mantém-se estável (**Fig. 12b**). Assim sendo, estamos perante uma transição β/α . A deconvolução do sinal mostra que ao longo dos 50 min. em que a amostra é exposta a 80°C, observamos uma perda da estrutura folha- β para as duas outras estruturas (**Tabela 7**). O ciclo descendente não mostra grandes alterações no sinal (**Fig. 12c**), mas as deconvoluções mostram que se perde parte da conformação folha- β na transição entre 80°C e 40°C (**Tabela 7**). Ao comparar os espectros a 20°C (**Fig. 12d**), podemos verificar a diminuição significativa do sinal a 200 nm e um ligeiro aumento na gama dos 210-230 nm devido à formação de hélice- α e de estrutura desordenada sacrificando folha- β .

4.2.3. Estudo cinético estrutural

Após os resultados obtidos no estudo anterior decidiu-se realizar uma experiência para determinar o efeito do aquecimento em amostras envelhecidas de poliglutaminas. Para isso utilizaram-se amostras dos três péptidos (0,002 mM a pH 7) que ainda não tinham sido aquecidas. Assim, as soluções dos péptidos foram aquecidas até 80°C e mantiveram-se a essa temperatura durante 1h. Após esse período, retiraram-se as amostras e deixaram-se arrefecer lentamente até à temperatura ambiente. Os espectros foram depois adquiridos a 20°C e os resultados são apresentados na **Tabela 8** e **Fig. 13**.

Como esperado, a Q8 e Q12 não apresentam qualquer sinal de uma estrutura em folha- β no início da experiência. A Q16 apresenta a mesma quantidade de folha- β semelhante à apresentada no final do ciclo descendente no ensaio anterior (**Tabela 7**). Ao longo dos 9 dias em que decorreu esta experiência, o sinal de CD correspondente às amostras Q8 e Q12 não sofreu variação significativa (**Fig. 13a e b**). O sinal da Q16 aumenta na gama dos 210-230 nm

Tabela 8 – Deconvoluções dos espectros obtidos a ao longo do tempo para a Q8, Q12 e Q16. Fracções das três principais estruturas secundárias para cada tempo e poliglutamina. Unidades de tempo representadas em horas.

	Tempo (h)	0	24	48	120	168	216
Q8	Hélice- α	0,18	0,18	0,17	0,17	0,18	0,18
	Folha- β	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	R. Coil	0,82	0,82	0,83	0,83	0,82	0,82
Q12	Hélice- α	0,24	0,24	0,24	0,25	0,23	0,23
	Folha- β	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	R. Coil	0,76	0,76	0,76	0,75	0,77	0,77
Q16	Hélice- α	0,22	0,35	0,37	0,30	0,21	0,27
	Folha- β	0,55	0,52	0,49	0,42	0,31	0,15
	R. Coil	0,23	0,13	0,14	0,28	0,48	0,58

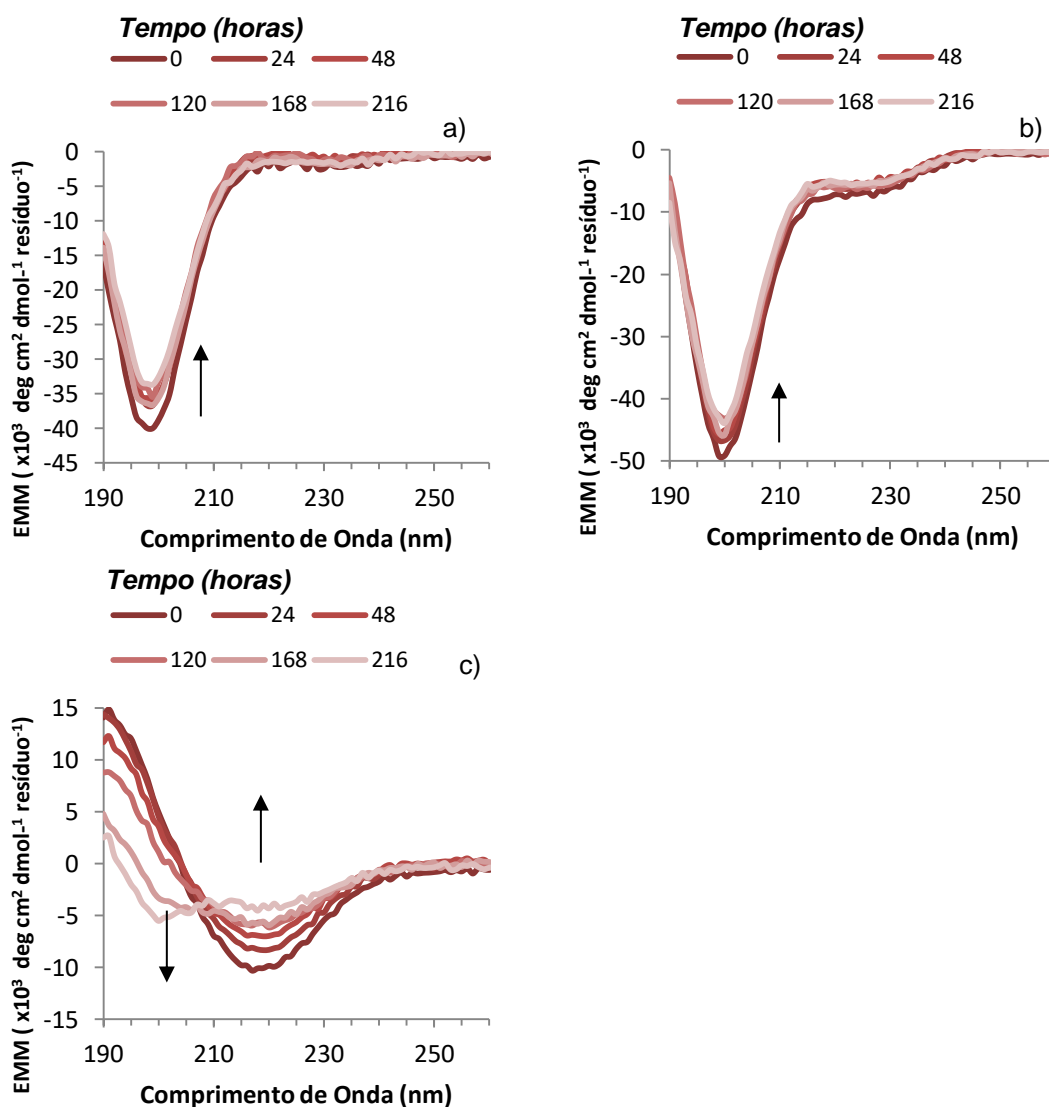


Fig. 13 – Espectros de CD das poliglutaminas ao longo de 9 dias. As soluções Q8 (a), Q12 (b) e Q16 (c) foram diluídas em água desionizada para uma concentração de 0.002 mM. Todas as poliglutaminas foram aquecidas a 80°C durante 1 hora antes a realização dos ensaios.

e diminui aos 200 nm ao longo do ensaio. Este parece adquirir um padrão semelhante ao sinal de estrutura desordenada ao longo do tempo. (**Fig.13c**). Os resultados das deconvoluções dos sinais obtidos para a Q16 mostram uma transição significativa de folha- β para hélice- α .

4.3. Caracterização das partículas em solução por DLS

Neste estudo foram utilizadas amostras de soluções frescas de cada uma das poliglutaminas com uma concentração de 0,2 mM, pH 7. Os resultados, obtidos a 20°C, para o fitting das curvas de autocorrelação com decaimentos exponenciais, demonstraram que a poliglutamina mais curta (Q8) apresenta tempos de decaimento superiores às outras duas poliglutaminas (menor coeficiente de difusão), sendo que a Q16 mostra o decaimento mais rápido (**Fig. 14**) (maior coeficiente de difusão). Por outro lado a amostra Q16 dispersa três vezes mais luz que a Q12 e seis vezes mais que a Q8, sendo a intensidade de luz dispersa proporcional ao tamanho dos agregados.

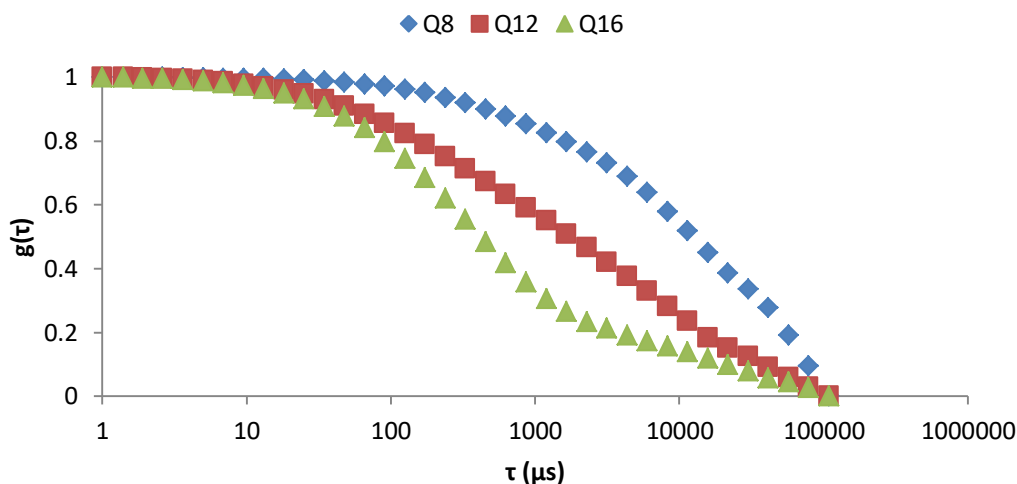


Fig. 14 – Curvas de auto-correlação normalizadas referentes às várias poliglutaminas. A concentração das amostras estudadas foi de 0,2 mM. A análise decorreu à temperatura de 20°C.

A análise das curvas de auto-correlação mostra a existência de uma relaxação biexponencial para as três amostras. Calcularam-se os factores pré-exponenciais (a_1 e a_2 , **Tabela 9**) e diâmetros hidrodinâmicos (Z_1 e Z_2) para cada população. Assume-se que estas duas populações (A_1 e A_2) sejam de agregados de poliglutaminas. A população A_1 constitui

Tabela 9 – Factores pré-exponenciais (a_1 , a_2) e diâmetro hidrodinâmicos (Z_1 e Z_2) para os dois tipos de agregados (A_1 e A_2) e intensidade de luz dispersa de cada amostra.

Amostra	Luz Dispersa (kCPS)	a_1	a_2	Z_1 (nm)	Z_2 (nm)
Q8	586	0,26	0,74	82,38	2220,65
Q12	1123	0,45	0,55	19,23	879,17
Q16	3399	0,73	0,27	20,09	1150,50

maioritariamente a Q16 e possui um diâmetro hidrodinâmico de ~20 μm nas amostras Q12 e Q16. Já nas Q8, o seu diâmetro aumenta para 82,38 μm . A segunda população de agregados (A2) constitui 74% da amostra Q8 e possui diâmetros muito superiores à primeira população (**Tabela. 9**). A quantidade de luz dispersa por cada amostra parece estar relacionada com as características de cada população., i.e, com a diferença entre o índice de refração dos agregados e o índice de refração do solvente. Agregados de baixa densidade, contendo solvente encapsulado tendem a dispersar menos luz por ter um índice de refração próximo do solvente.

5. Discussão

5.1. Síntese, Purificação e Caracterização

5.1.1. Aminoácidos e sequência dos péptidos

Os péptidos utilizados nesta Tese, Ac-K₂WQ_nAK₂-NH₂ (n = 8, Q8; 12, Q12 ou 16, Q16), foram desenhados de modo a apresentarem um número variável de resíduos de glutamina, possuem características anfifílicas e conterem um resíduo aminoácido fluorescente. Tendo em consideração o diferente número de glutaminas na sequência poder-se-ia estudar o efeito do aumento da cadeia poliglutaminica na formação dos potenciais agregados. O aminoácido triptofano foi adicionado aos péptidos devido as suas características fotoquímicas, o que permitiria a quantificação das soluções dos péptidos por espectroscopia de UV-Vis, inclusive fluorescência. Além disso, foram ainda desenhados de modo a apresentarem solubilidade elevada em soluções aquosas. Para isso foram adicionados dois monómeros do aminoácido lisina a cada uma extremidade. Estes aminoácidos encontram-se carregados positivamente até pH 10,5, o que contribui para a solubilidade do péptido.^[23] Um péptido sem resíduos carregados pode ser mais apropriado ao estudo de sequências de Gln internalizadas numa proteína, péptidos de poliQ's carregados mantêm uma solubilidade semelhante às sequências de poliQ fundidas com proteínas ^[24]. A adição de lisinas permitiu contrabalançar a alta hidrofobicidade do triptofano e a realização dos estudos em soluções aquosas. A alanina, por ser um aminoácido neutro foi adicionada para equilibrar ambas as extremidades e para que a cadeia de glutaminas possua o mesmo número total de aminoácidos.

5.1.2. Síntese Automática

Os péptidos foram obtidos com um grau de pureza $\geq 98\%$, determinado por HPLC (sistema analítico) e caracterizados por Espectrometria de massa (ESI-MS).

O sintetizador automático de péptidos realizou as sínteses continuamente sem supervisão, por isso foi necessário uma preparação cuidadosa de todos os reagentes e materiais antes do início da síntese. Um dos pontos que se revelou crítico em todo o processo foi a transferência automática da resina selecionada para o vaso reaccional. De facto, a resina NovaPEG utilizada nas sínteses expande consideravelmente quando em contacto com o solvente, o que leva a um aumento do seu volume para o dobro do inicial e à formação de aglomerados de tamanho considerável. Assim, logo no início da síntese, quando se faz a transferência da resina suspensa em DMF para o vaso reaccional, a parte da resina que está aglomerada poderá não entrar no tubo de recolha e chegar ao vaso. Quando isto acontece, ou seja quando só parte da resina é utilizada na síntese, há uma diminuição directa do rendimento total e um elevado desperdício de reagentes. De modo a evitar esta situação, a resina foi pré-suspensa em DMF fora do equipamento e a suspensão agitada muito suavemente para dispersar os aglomerados

de maiores dimensões formados. Só depois a resina foi transferida automaticamente no equipamento para o vaso reaccional onde se dá a síntese dos péptidos. Os passos seguintes, nomeadamente a síntese automática, clivagem manual, precipitação e liofilização decorreram sem quaisquer problemas adicionais.

5.1.3. *Purificação das poliglutaminas*

Foram testados diferentes métodos de eluição para a purificação das poliglutaminas por HPLC preparativo. O método de eluição foi ensaiado inicialmente no sistema de HPLC analítico de modo desperdiçar-se a menor quantidade possível de amostra. Após ter sido determinado um método de separação eficaz, este foi adaptado ao sistema preparativo.

Após um processo de optimização foi possível encontrar um método experimental que permitiu a purificação das poliglutaminas e que está descrito na **Tabela 1** e **Fig. 7 (Procedimento experimental)**.

Durante purificações consecutivas em diferentes dias é importante que as amostras a purificar sejam congeladas com azoto líquido antes de serem conservadas e armazenadas a -80°C .^[25] Amostras que sejam congeladas lentamente podem ter os seus perfis cromatográficos alterados durante subseqüentes purificações. Alterações nos tempos de retenção de alguns picos, mudanças nas intensidades relativas, ou a súbita ausência de picos são algumas alterações verificadas. Estas alterações parecem estar associadas aos ciclos de congelamento/descongelamento a que as amostras são submetidas. Mesmo congelando com azoto líquido e conservando a -80°C , estas alterações são visíveis nos perfis cromatográficos após vários ciclos. A Q16 parece ser a amostra mais vulnerável e a Q8 a mais estável a estes tratamentos, o que parece estar relacionado com o aumento do número de glutaminas na cadeia peptídica. Este comportamento poderá ser explicado com a formação de agregados e a sua retenção na coluna, o que poderá justificar as mudanças nas intensidades relativas e/ou ausência dos sinais nos perfis cromatográficos observadas.

A solução de HFIP/TFA 1:1 é normalmente utilizada em síntese peptídica quando se trabalha com sequências difíceis, com tendência a formar agregados.^[17, 24] O tratamento com esta solução dispersa grande parte da população de agregados e aumenta a solubilidade dos péptidos. Neste estudo verificou-se que este tratamento também ajuda com amostras envelhecidas por vários ciclos de congelamento. De facto, amostras com perfis cromatográficos alterados após vários ciclos de congelação, retomavam os perfis iniciais após um segundo tratamento. Isto corrobora a ideia que a formação de agregados parece ser a principal razão para as alterações observadas nos perfis cromatográficos. Também sugere que parece ser possível acelerar a formação de agregados por congelamento lento das amostras de poliglutaminas. No entanto, este factor não foi aprofundado neste estudo. Recomenda-se que em futuras sínteses de péptidos semelhantes se congelem as amostras em azoto líquido antes de as armazenar a -80°C e que se evite temperaturas baixas durante a purificação.^[25]

5.2. Estudo Estrutural das Poliglutaminas e seus agregados

Uma vez que o estudo se foca no fenómeno de agregação e na caracterização dos agregados como estrutura tridimensional, as amostras não foram filtradas antes de cada análise à ao contrario de estudos semelhantes ^[18, 19, 25]. Desta maneira estudou-se o efeito do pH e da temperatura na estrutura dos agregados de modo a caracterizá-los e a relacionaram-se os resultados obtidos com o comprimento da cadeia de glutaminas.

5.2.1. Efeito do pH na estrutura secundária

Estudou-se a estrutura secundária das poliglutaminas por CD na gama de pH's 5 - 9. É comum conservar péptidos com tendência para agregar a pH baixos ^[14]. Por isso tentou-se relacionar este facto com as mudanças estruturais resultantes da alteração do valor de pH. A gama de pH estudados encontra-se abaixo do pKa das lisinas. Assim não estavam presentes alterações conformacionais relacionadas com a perda de carga total dos péptidos.

O pH afecta estruturalmente as poliglutaminas. A pH's ácidos as poliglutaminas Q8 e Q12 apresentam uma estrutura maioritariamente desorganizada (**Tabela 4**). À medida que o pH aumenta verificamos um aumento conformacional de hélice- α . Hélices- α e folhas- β são estabilizadas por pontes de hidrogénio intra e inter-moléculares. ^[1] A protonação dos elementos que estabilizam estas estruturas desestabilizam a conformação, desorganizando-as. Por isso observamos teores mais baixos de hélice- α à medida que expomos as poliglutaminas Q8 e Q12 a pH's mais baixos. Não são visíveis fracções consideráveis de folha- β , e consequentemente agregados ^[19, 26, 27] nestas duas amostras. Isto possivelmente porque se tratavam de amostras frescas.

A Q16 apresenta uma estrutura em folha- β predominante ao longo da gama de pH estudada (**Tabela 4**). A pH's ácidos (5 e 6) podemos observar pequenas quantidades de hélice- α . A pH neutro e básico observamos apenas folha- β . A presença de protões livres parece desfavorecer a estrutura de folha- β e favorecer a hélice- α . Estes resultados são contraditórios aos obtidas para a Q8 e Q12, onde níveis de protonação mais elevados favorecem uma estrutura desordenada sacrificando a hélice- α . É possível que estejamos a observar uma transição entre folha- β /estrutura desordenada e que o resultado da deconvolução seja um falso-positivo. No entanto, sem dados referentes unicamente à conformação de hélice- α para estes péptidos, não é possível obter uma deconvolução exacta. A fracção que se encontra em hélice- α a pH ácido pode corresponder às extremidades carregadas da Q16. À medida que o pH é neutralizado, a diminuição das forças iónicas entre as cadeias laterais carregadas e o meio permite que estas transitem de hélice- α para folha- β . No espectro da Q16 (**Fig. 9c**) verifica-se que a pH 5 e 6 o sinal se mantém praticamente constante. A pH 7 observamos o aumento do sinal a 200 nm e um desvio do pico máximo para comprimentos de onda superiores, o que parece corresponder a uma transição $\alpha \rightarrow \beta$. ^[17, 28]

Concluindo, pH's ácidos parecem desfavorecer a estrutura em hélice- α , mas não influenciam a estrutura de folha- β previamente formada.

5.2.2. Efeito da Temperatura na estrutura secundária

As poliglutaminas foram submetidas a ciclos de temperatura para determinar a existência de um *melting point* dos agregados.

A Q8 aparenta formar hélice- α a partir da estrutura anteriormente desorganizada com o aumento da temperatura. Após retomar a temperatura inicial, esta hélice- α transiente desaparece (**Fig. 10**). Esta característica é encontrada em proteínas intrinsecamente desordenadas. Esta pequena variação do sinal de CD deve-se a formação de hélice- α acompanhada da contracção do conjunto conformacional. ^[29]

As Q12 e Q16 mostram inicialmente conformações maioritariamente em folha- β . Para estas amostras foi possível definir o *melting point* entre 50°C e 60°C. Para ambas as amostras, não foi possível estabilizar o sinal a 60°C e 70°C. Apenas a 80°C foi possível estabilizar o sinal após algum tempo (**Fig. 11b** e **Fig. 12b**). Aos 80°C podemos observar uma transição de folha- β para estrutura desordenada, o que poderá ser considerado uma desnaturação. Ao diminuir a temperatura, verificamos alterações semelhantes às observadas para a Q8. É possível que todas as amostras de poliglutaminas estudadas apresentem esta característica de proteína intrinsecamente desordenada. ^[29] Apesar dos resultados da deconvolução da Q16 (**Tabela 7**) não indicar a diminuição de hélice- α ao longo do ciclo descendente, as pequenas variação no sinal aos 200 nm e entre 210 nm e 230 nm seguem o mesmo padrão das outras poliglutaminas (**Fig. 12c**). Ao fim de ambos os ciclos, foi possível remover quaisquer indícios de folha- β da Q12 (**Tabela 6**). No entanto, a conformação da Q16 manteve-se predominantemente em folha- β .

A Q12 no início deste estudo (**Fig. 11a**) apresenta estrutura folha- β não observada no estudo do pH nas mesmas condições (**Fig. 9b**, pH 7). Isto deve-se ao envelhecimento da amostra.

Concluindo, a estrutura de folha- β e, por complemento, os agregados, possuem um *melting point* entre os 50°C e 60°C. As poliglutaminas apresentam um comportamento semelhante a proteínas intrinsecamente desordenadas a diferentes temperaturas. ^[29]

5.2.3. Análise cinética das poliglutaminas

Ao comparar os resultados do estudo do pH e de temperatura nas mesmas condições (20°C, pH 7) podemos observar mudanças significativas na Q12. No espaço de tempo entre análises, a Q12 passou a apresentar sinais da conformação folha- β . Note-se também que ao fim de ambos os ciclos a Q12 voltou a apresentar o sinal inicial dos ensaios de pH. Com estes resultados em mente e o objectivo de estudar a cinética da formação de folha- β , estudou-se a evolução dos sinais de CD das poliglutaminas após estas terem sido aquecidas a 80°C durante 1 hora.

As pequenas variação observadas na Q8 e Q12 ao longo deste estudo não permitiram inferir quaisquer mudanças na estrutura secundária (**Fig. 13a** e **b**). Os resultados das deconvoluções não mostram alterações significativas (**Tabela 8**). Enquanto que estes

resultados são esperados para a Q8, seria esperado que a Q12 mostrasse sinais de transição para folha- β . Sabe-se que a agregação possui um passo de nucleação longo.^[17] No entanto, é possível acelerar este processo pela introdução de uma *seed* no meio. A adição de pequenos agregados (*seed*) iria acelerar este processo.^[30, 31] A estabilização do sinal durante este período de tempo indica que não há vestígios de agregados na amostra Q12 após o tratamento.

Ao longo dos 9 dias, a Q16 aparenta perder a sua conformação estrutural. Seria de esperar que a porção de folha- β fosse aumentando ao longo do tempo. Como parte da sua estrutura já se encontra em folha- β (**Tabela 8**), seria de esperar que o crescimento da folha- β fosse catalisado pela mesma (*seed*) aumentando a velocidade de transição. É observado no entanto, uma transição para estrutura desordenada (**Fig. 13c**). A diminuição do sinal a 200 nm e o aumento do mesmo entre os 210 nm e 230 nm ditam esta transição.^[27, 28] O tratamento apresenta um efeito desnaturante que se prolonga ao longo do tempo. É possível que a ruptura da estrutura em folha- β em determinados pontos destabilize a estrutura global, levando a uma desorganização lenta e gradual.

Em suma, o tratamento a 80°C parece eliminar os vestígios de agregados para a Q12. A Q16 sofre uma desnaturação lenta e prolongada após tratamento. Seria importante continuar a documentar a evolução da Q16 e verificar se o sinal estabilizaria novamente em folha- β . A amostra Q12 consegue adquirir a conformação de folha- β (**Fig. 11a**). Já a Q8, não apresenta alterações significativas na mesma situação. A Q8 pode não ser capaz de formar agregados em folha- β , ou a influência desta estrutura no sinal de CD ser pequena.

5.2.4. *Análise do tamanho de partículas em solução*

A análise por DLS foi realizada com amostras frescas, a 20°C e a pH 7. A presença de uma relaxação bi-exponencial revela dois tipos de populações nas amostras de poliglutaminas. Uma das populações é composta por agregados de maior tamanho (A2) e outra por agregados de tamanho inferior (A1) (**Tabela 9**). Os factores pré-exponenciais mostram que a amostra Q8 é composta maioritariamente por A2, a Q16 por A1 e a Q12 é uma mistura equilibrada de ambas as populações. Ao observar a intensidade de luz dispersa para cada amostra podemos verificar um aumento exponencial com o aumento do número de glutaminas. No entanto, esta variação é devida as características de cada população e não ao comprimento da cadeia.

Agregados podem formar cristais, fibras amilóides ou agregados amorfos.^[32] Agregados amorfos que podem conter moléculas de solvente no seu interior, aproximando o índice de refração da partícula ao do meio. Agregados cristalinos, são estruturas compactas e organizadas.^[32] A diferença de cristalinidade entre as duas populações de agregados explica as diferenças observadas para a luz dispersa para cada amostra. Esta característica parece estar relacionada com a estrutura das poliglutaminas. A organização dos agregados em folha- β na Q16 (**Fig. 9c**) parece conferir-lhe uma estrutura compacta, mais cristalina. Comparativamente, agregados formados por péptidos desorganizados (**Fig. 9a**), como observados para a Q8, formam estruturas de maiores dimensões e menor índice de refração.

A conformação de folha- β (**Fig. 11a**) e estrutura desorganizada (**Fig. 9b**) foram observadas para a amostra Q12. Assim sendo, é possível que os agregados amorfos (desorganizados) reorganizem a sua estrutura formando agregados mais compactos.

6. Conclusão

Foi possível sintetizar poliglutaminas de tamanho e sequência controlada. Estas poliglutaminas são solúveis em soluções aquosas dentro das concentrações, pHs e temperaturas estudados. Após purificação (> 98% pureza) os péptidos foram caracterizadas por espectrometria de massa (ESI-MS).

Por DLS foi possível observar a presença de 2 tipos de agregados. Comparando os resultados de CD com os de DLS podemos caracterizar a estrutura dos dois tipos de agregados. Os agregados de maiores dimensões possuem uma estrutura maioritariamente desorganizada e constituem mais de 70% da amostra Q8. Inversamente, os agregados de menores dimensões possuem predominantemente uma estrutura em folha- β e constituem mais de 70% da amostra Q16. A amostra Q12 durante este estudo apresentou-se num ponto médio ajudando a compreender a transição entre a Q8 e Q16 (**Tabela 10**).

A poliglutamina Q8 mostra a estrutura mais estável das 3 poliglutaminas estudadas. O seu sinal de CD possui variações mínimas aos diferentes pH's estudados e demonstra total recuperação no fim do ciclo de aquecimento. A Q12 é a sequência peptídica mais flexível das três poliglutaminas. Esta amostra mostra sinais folha- β nos espectros iniciais do ciclo de aquecimento, enquanto no final dos ciclos apresenta um sinal idêntico ao observado nas análises a diferentes pHs. Devido a esta flexibilidade foi possível explicar as diferenças entre a Q8 e Q16. A Q16 foi a sequência que conduziu a resultados mais em linha com o que seria de esperar para um péptido com capacidade de agregação, mostrando características de folha- β nos espectros de CD ao longo das diferentes análises.

Os resultados das deconvoluções foram obtidos por comparação com os diferentes espectros da polilisina. No entanto é difícil obter quantidades concretas das estruturas como hélice- α e folha- β . Foi possível obter um espectro de CD para uma estrutura maioritariamente em folha- β (**Fig. 9c**, pH 7) e o sinal de estrutura desordenada distingue-se dos demais. Assim sendo, para entender melhor as proporções de cada estrutura nestes péptidos e validar os resultados das deconvoluções, seria necessário obter uma aproximação de um espectro de hélice- α . Para isso poder-se-ia estudar por CD o comportamento destes péptidos em diferentes proporções de solventes indutores de hélice- α como TFA e HFIP.^[32, 33] Com esse espectro seria possível deconvolucionar os espectros obtidos com melhor exactidão e compreender melhor as transições estruturais observadas.

Devido a limitações de tempo (disponível), o estudo cinético foi limitado a 9 dias. Seria importante continuar estes ensaios durante períodos de tempo muito superiores para confirmar as conclusões tiradas. A utilização do método de *seeding* também seria importante para analisar diferentes tempos de formação/alteração dos agregados e espectros de amostras completamente agregadas.

O resultado dos ciclos de aquecimento pode ser útil em futuras sínteses de péptidos semelhantes. Para péptidos sensíveis a pH baixos mas resistentes à variação de temperatura,

o aquecimento acima dos 50°C por determinados períodos de tempo pode substituir o tratamento com TFA/HFIP 1:1. No entanto, seria preciso realizar um estudo comparando ambos os métodos de modo a estabelecerem-se vantagens e desvantagens de cada um deles.

Os objectivos para a síntese foram cumpridos. Os péptidos sintetizados possuem as características desejadas. Os objectivos da caracterização foram também alcançados. As amostras das diferentes poliglutaminas foram caracterizadas por CD e DLS. No entanto, para esclarecer lacunas na análise dos resultados obtidos seria necessário análises específicas já referidas neste capítulo.

Tabela 10 – Sumário dos resultados de Dicroísmo Circular

Estrutura		Estudo da Temperatura							
		Estudo do pH		Ciclo		Ciclo		Estudo Cinético	
				Ascendente	Descendente	Ascendente	Descendente		
		5	9	20°C	80°C	80°C	20°C	0 h	216 h
Q8	Hélice-α	0,22	0,23	0,20	0,22	0,22	0,20	0,18	0,18
	Folha-β	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Desordenada	0,78	0,77	0,80	0,78	0,78	0,80	0,82	0,82
Q12	Hélice-α	0,28	0,39	0,20	0,31	0,29	0,27	0,24	0,23
	Folha-β	<0,01	<0,01	0,69	0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	Desordenada	0,72	0,61	0,11	0,64	0,71	0,73	0,76	0,77
Q16	Hélice-α	0,29	<0,01	<0,01	0,07	0,19	0,24	0,22	0,27
	Folha-β	0,71	>0,99	>0,99	0,93	0,64	0,56	0,55	0,15
	Desordenada	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,17	0,20	0,23	0,58

Bibliografia

- [1] - Quintas, A., Freire, A. P., & Halpern, M. J. (2008). Capítulo 10 - Estrutura e Propriedades dos aminoácidos e Péptidos. *Bioquímica: organização molecular da vida*. Edições Lidel, Lisboa. pp. 141-159.
- [2] - Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2002). Capítulo 5 – Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas *Lehninger princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 3, pp. 89-122.
- [3] - Lu, X., & Murphy, R. M. (2014). Synthesis and disaggregation of asparagine repeat-containing peptides. *Journal of Peptide Science*, 20(11), 860-867.
- [4] - Nasir, J., Floresco, S. B., O'Kusky, J. R., Diewert, V. M., Richman, J. M., Zeisler, J., Hayden, M. R. (1995). Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, 81(5), 811-823.
- [5] - Nance, M. A., Mathias-Hagen, V., Breningstall, G., Wick, M. J., & McGlennen, R. C. (1999). Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with juvenile Huntington's disease. *Neurology*, 52(2), 392-392.
- [6] - Kim, M. W., Chelliah, Y., Kim, S. W., Otwinowski, Z., & Bezprozvanny, I. (2009). Secondary structure of Huntingtin amino-terminal region. *Structure*, 17(9), 1205-1212.
- [7] - MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., MacFarlane, H. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72(6), 971-983.
- [8] - Fox, J. H., Barber, D. S., Singh, B., Zucker, B., Swindell, M. K., Norflus, F., Hersch, S. M. (2004). Cystamine increases l-cysteine levels in Huntington's disease transgenic mouse brain and in a PC12 model of polyglutamine aggregation. *Journal of neurochemistry*, 91(2), 413-422.
- [9] - Legleiter, J., Mitchell, E., Lotz, G. P., Sapp, E., Ng, C., DiFiglia, M., Muchowski, P. J. (2010). Mutant huntingtin fragments form oligomers in a polyglutamine length-dependent manner in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 285(19), 14777-14790.
- [10] - Marsh, J. L., Walker, H., Theisen, H., Zhu, Y. Z., Fielder, T., Purcell, J., & Thompson, L. M. (2000). Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in Drosophila. *Human molecular genetics*, 9(1), 13-25.
- [11] - Zhemkov, V. A., Kulinskaya, A. A., Bezprozvanny, I. B., & Kim, M. (2016). The 2.2 Angstrom resolution crystal structure of the carboxyterminal region of ataxin-3. *FEBS open bio*, 6(3), 168-178.
- [12] - Albericio, F. (Ed.). (2000). Solid-phase synthesis: a practical guide. *CRC Press*.
- [13] - Behrendt, R., White, P., & Offer, J. (2016). Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science*, 22(1), 4-27.
- [14] - Chan, W. C., & White, P. D. (2000). Fmoc solid phase peptide synthesis. *Oxford University Press*.

- [15] - García-Martín, F., Quintanar-Audelo, M., García-Ramos, Y., Cruz, L. J., Gravel, C., Furic, R., Albericio, F. (2006). ChemMatrix, a poly (ethylene glycol)-based support for the solid-phase synthesis of complex peptides. *Journal of combinatorial chemistry*, 8(2), 213-220.
- [16] - Woody, R. W. (1995). Circular dichroism. *Methods in enzymology*, 246, 34-71.
- [17] - Greenfield, N. J., Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, 8(10), 4108-4116.
- [18] - Walters, R. H., Murphy, R. M. (2009). Examining polyglutamine peptide length: a connection between collapsed conformations and increased aggregation. *Journal of molecular biology*, 393(4), 978-992.
- [19] - Inayathullah, M., Tan, A., Jeyaraj, R., Lam, J., Cho, N. J., Liu, C. W., Rajadas, J. (2016). Self-assembly and sequence length dependence on nanofibrils of polyglutamine peptides. *Neuropeptides*, 57, 71-83.
- [20] - Goldburg, W. I. (1999). Dynamic light scattering. *American Journal of Physics*, 67(12), 1152-1160.
- [21] - Sartor, M. (2003). Dynamic light scattering. *University of California, San Diego*, 2-21.
- [22] - Berne, B. J., Pecora, R. (2000). *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation.
- [23] - Marqusee, S., Robbins, V. H., & Baldwin, R. L. (1989). Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(14), 5286-5290.
- [24] - Wetzel, R. (2012). Physical chemistry of polyglutamine: intriguing tales of a monotonous sequence. *Journal of molecular biology*, 421(4), 466-490.
- [25] - Chen, S., & Wetzel, R. (2001). Solubilization and disaggregation of polyglutamine peptides. *Protein Science*, 10(4), 887-891.
- [26] - Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Inouye, H., Surewicz, W. K., Selkoe, D. J., Podlisny, M. B., & Kirschner, D. A. (1992). Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogs of Alzheimer amyloid. beta.-protein. *Biochemistry*, 31(44), 10716-10723.
- [27] - Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M., & Robinson, C. V. (2000). Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Science*, 9(10), 1960-1967.
- [28] - Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*, 1(6), 2876.
- [29] - Kjaergaard, M., Nørholm, A. B., Hendus-Altenburger, R., Pedersen, S. F., Poulsen, F. M., Kragelund, B. B. (2010). Temperature-dependent structural changes in intrinsically disordered proteins: Formation of α -helices or loss of polyproline II?. *Protein Science*, 19(8), 1555-1564.
- [30] - Danzer, K. M., Krebs, S. K., Wolff, M., Birk, G., Hengerer, B. (2009). Seeding induced by α -synuclein oligomers provides evidence for spreading of α -synuclein pathology. *Journal of neurochemistry*, 111(1), 192-203.

[31] - Bennett, R. E., DeVos, S. L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., Hyman, B. T. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *The American journal of pathology*.

[32] - Hirota, N., Goto, Y., Mizuno, K. (1997). Cooperative α -helix formation of β -lactoglobulin and melittin induced by hexafluoroisopropanol. *Protein science*, 6(2), 416-421.

[33] - Andersen, N. H., Dyer, R. B., Fesinmeyer, R. M., Gai, F., Liu, Z., Neidigh, J. W., Tong, H. (1999). Effect of hexafluoroisopropanol on the thermodynamics of peptide secondary structure formation. *Journal of the American Chemical Society*, 121(42), 9879-9880.

Anexos

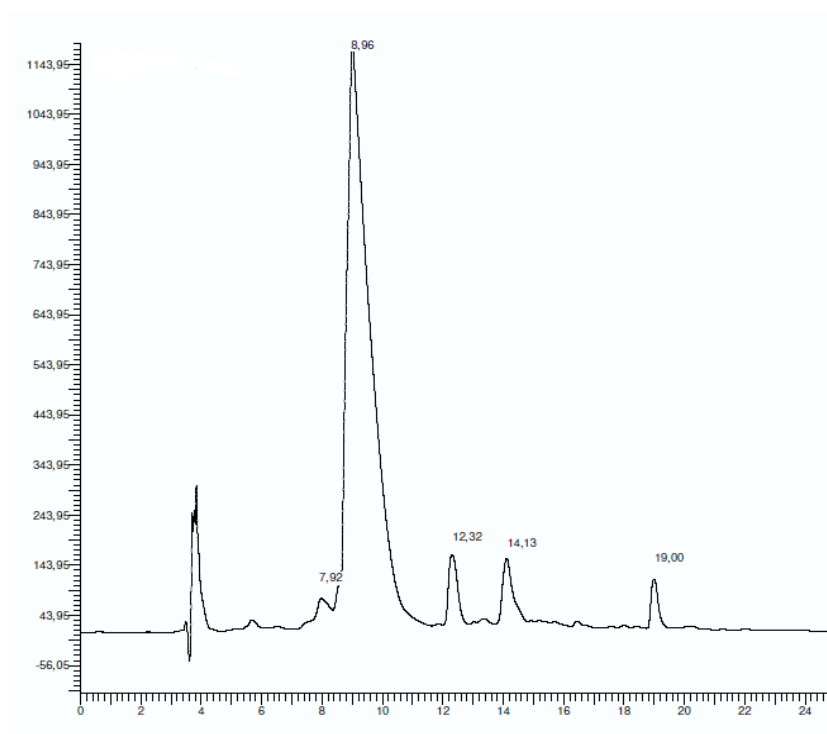


Fig. 15 – Cromatograma da Q8 antes da purificação (analítico)

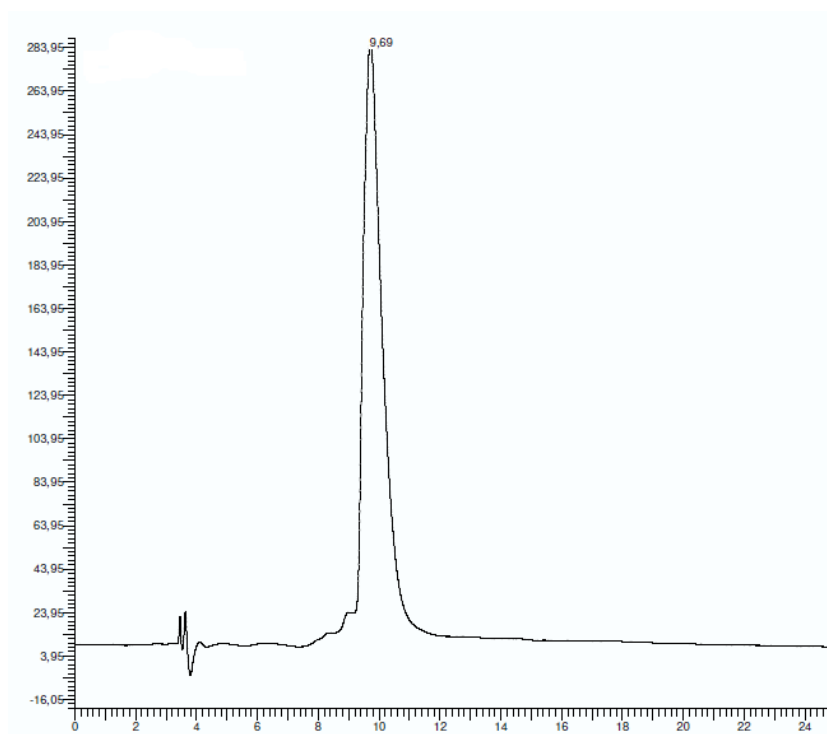


Fig. 16 – Cromatograma da amostra Q8 após purificação (analítico)

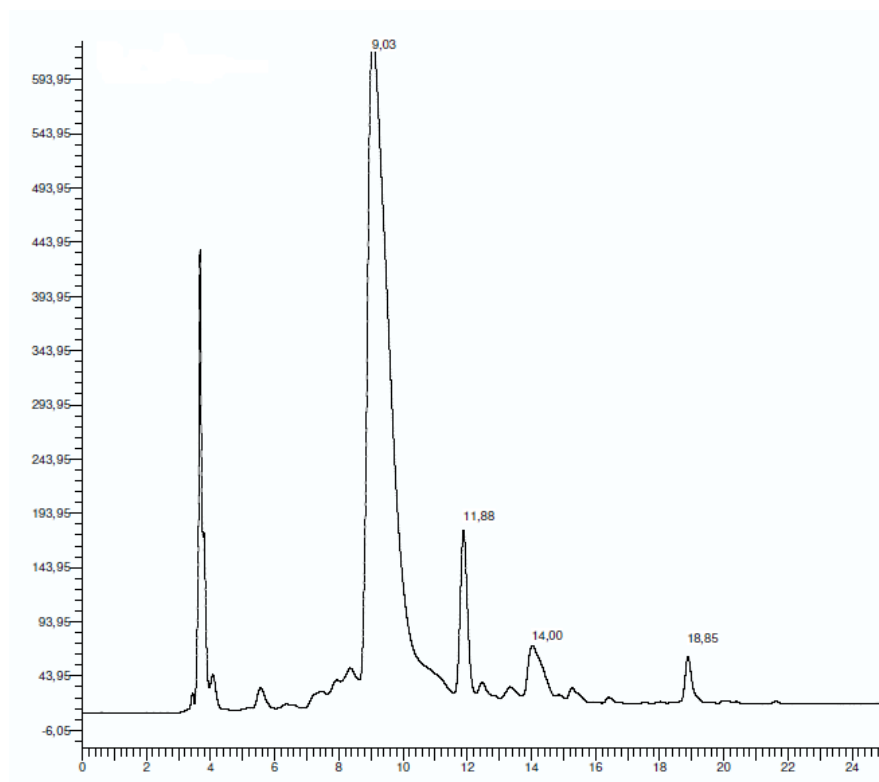


Fig. 18 – Cromatograma da Q12 antes da purificação. (analítico)

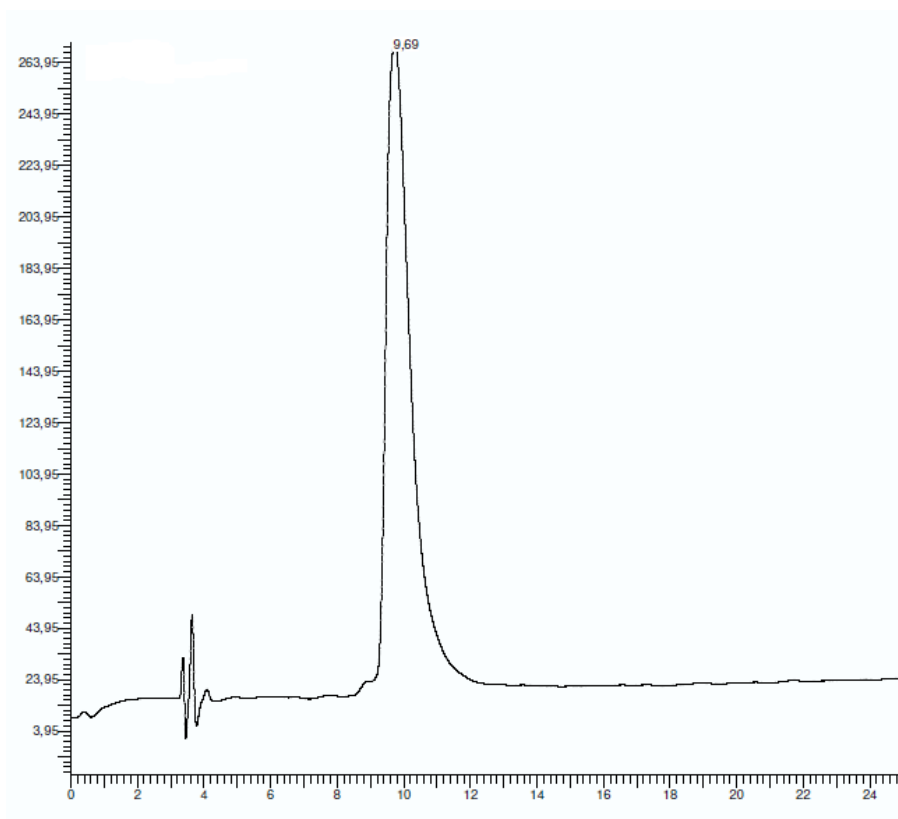


Fig. 17 – Cromatograma da Q12 após purificação. (analítico)

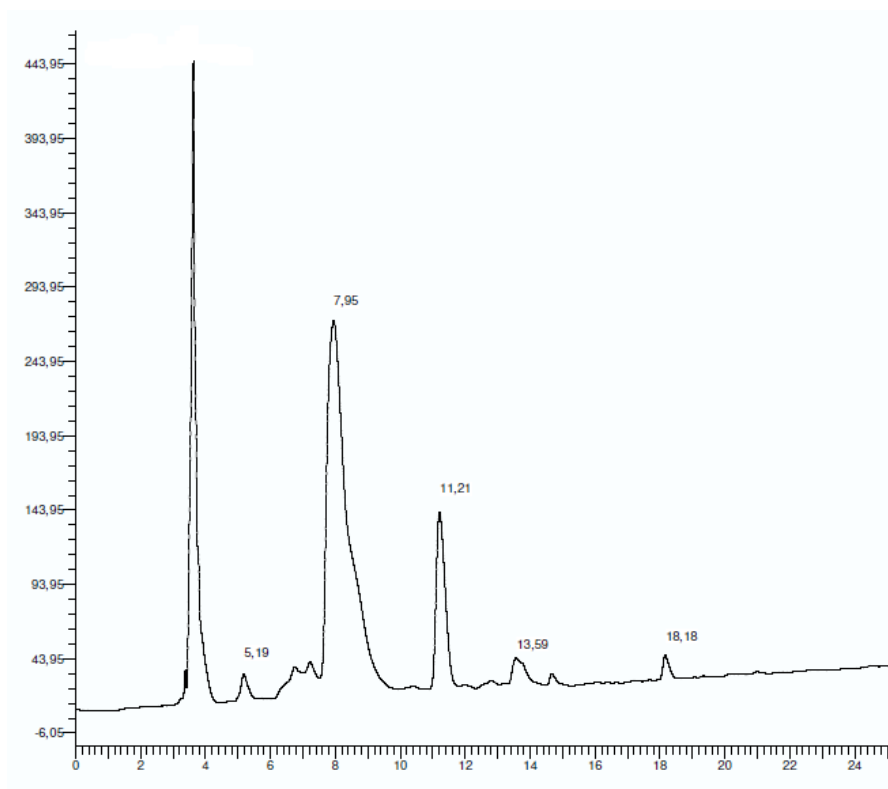


Fig. 20 – Cromatograma da Q16 antes da purificação (analítico).

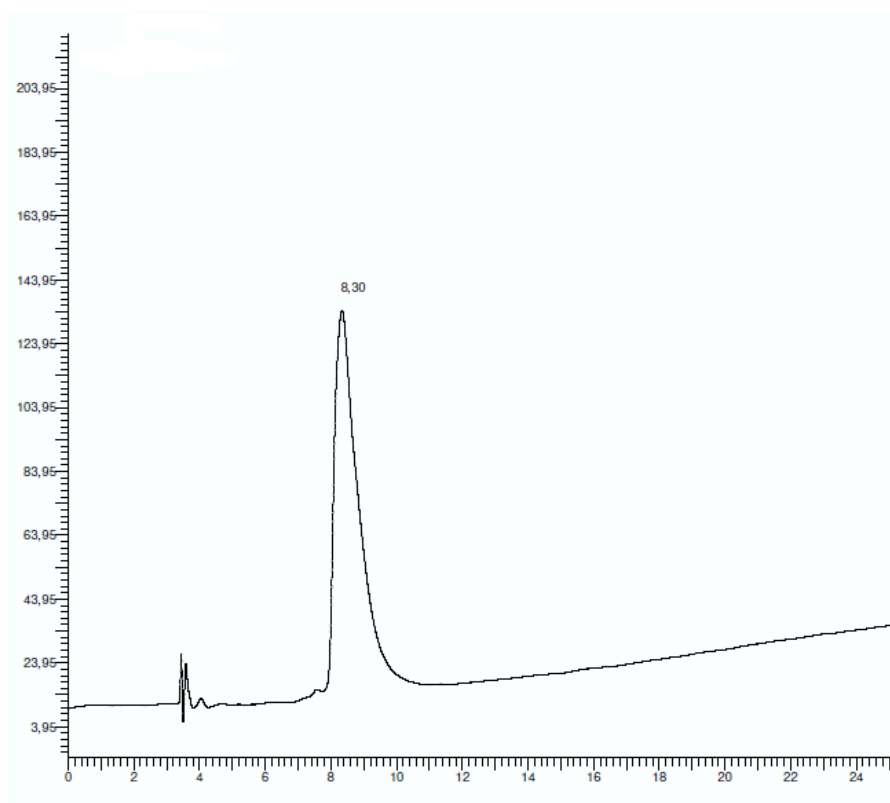


Fig. 19 – Cromatograma da Q16 após purificação (analítico).

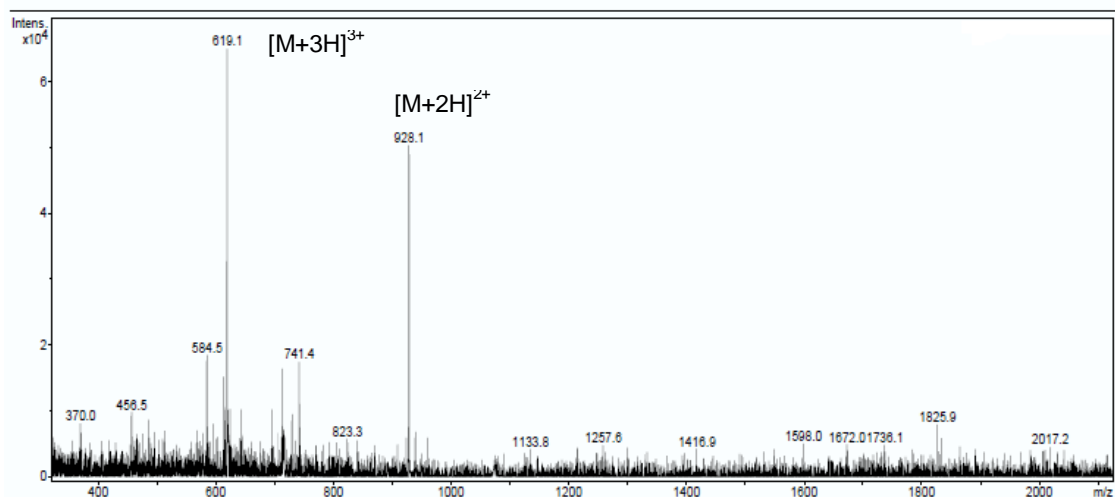


Fig. 21 – Espectro de massa da Q8.

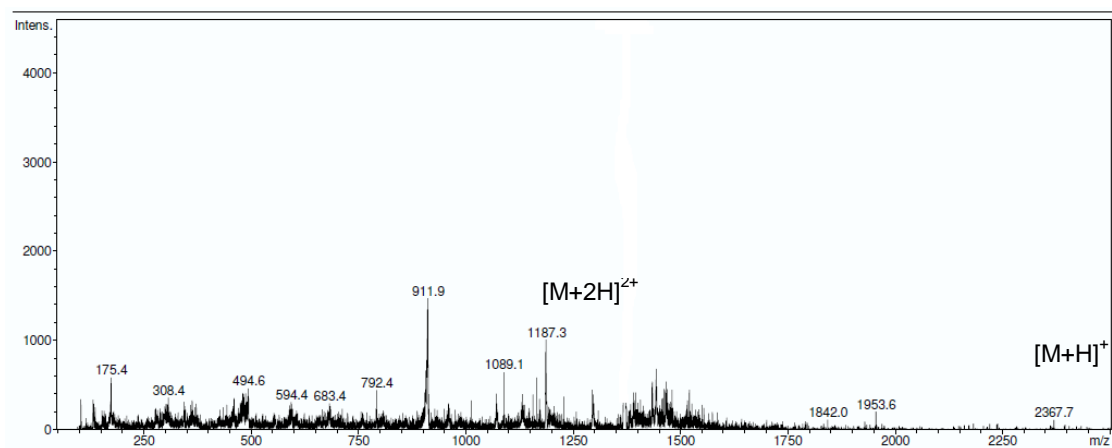


Fig. 22 – Espectro de Massa da Q12

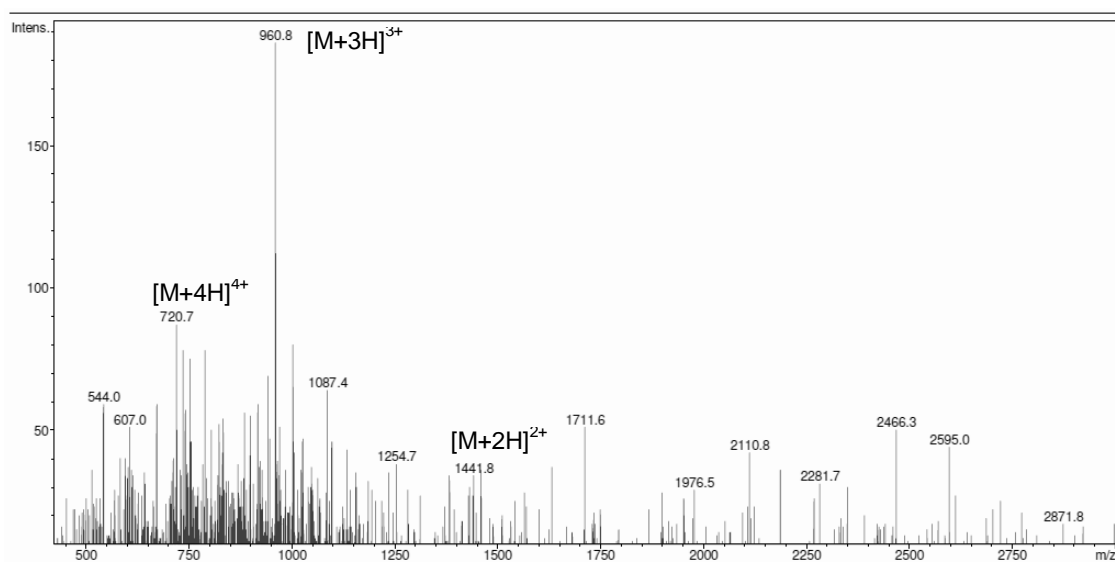


Fig. 23 – Espectro de Massa da Q16